

**UNIVERSIDAD NACIONAL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR**  
**ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**LICENCIATURA EN AGRICULTURA ALTERNATIVA**

**Evaluación de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces* sp.,  
como potenciales microorganismos solubilizadores de fósforo (P) en  
un suelo Andisol**

**Trabajo final de graduación, bajo la modalidad de tesis, sometido a consideración del  
Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional, para  
optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía, con énfasis en  
Agricultura Alternativa**

Bach. Luis Felipe Borbón Valverde

Heredia, Costa Rica

Octubre, 2023

Trabajo final de graduación, presentado como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura  
en Ingeniería en Agronomía

## **MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR**

---

M.Sc. José Alonso Calvo Araya  
Representante del Decanato de la Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

---

M.Sc. Andrés Alpízar Naranjo  
Director Escuela de Ciencias Agrarias

---

Lic. Steffany Orozco Cayasso  
Tutor de Tesis

---

Dr. Róger Muñoz Hernández  
Lector

---

Dr. Ramón Molina Bravo  
Lector

---

Bach. Luis Felipe Borbón Valverde  
Postulante

## DEDICATORIA

*A Dios, por darme la salud y las fuerzas para culminar una etapa más en mi desarrollo como profesional.*

*En especial, a mis padres Rodrigo Borbón (q.d.D.g) y Flor Valverde, no solo por haberme brindado mis estudios con mucho esfuerzo y sacrificio, sino que también por haberme inculcado los valores necesarios para alcanzar exitosamente mi profesión.*

*A mi hermana Diana Borbón y mi hermano Rodrigo Borbón, por todo su apoyo sincero e incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

*Eterno agradecimiento a mi tutora, Lic. Steffanny Orozco por su profesionalismo, compromiso, dedicación y acompañamiento en la culminación de este mi trabajo final de graduación.*

*A mis asesores, Dr. Ramón Molina y Dr. Róger Muñoz, quienes con su experiencia y valiosos conocimientos, me aconsejaron y guiaron de excelente manera para fortalecer la estructuración de este trabajo.*

*En especial, a los académicos M.Sc. Víctor Álvarez de la Escuela de Química y M.Sc. Alejandro Vargas de la Escuela de Ciencias Agrarias, por colaborarme amablemente con el análisis de ácidos orgánicos y pruebas estadísticas, respectivamente.*

*A Ana Laura Mena y Teresita Matamoros, por abrirme gentilmente las puertas de su empresa y facilitarme las bacterias evaluadas en esta investigación.*

*De igual manera, a Aida Lobo y Xavier Díaz, por su gentil colaboración.*

*A mis excompañeros, excompañeras y profesores con los que conviví durante mí transitar universitario, por haber formado parte importante en mi desarrollo como profesional.*

*A todos y todas, ¡muchas gracias!*

## RESUMEN

Este estudio evaluó la solubilización de fósforo (P) de las bacterias *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Streptomyces* sp., pertenecientes a la empresa Laboratorio BIOMACA®, como potenciales microorganismos que permitan a las plantas disponer de una mayor cantidad de P asimilable. Se hicieron ensayos en condiciones *in vitro*: pruebas de antagonismo con la técnica de estría cruzada, para descartar incompatibilidad entre las bacterias; evaluación cualitativa de la capacidad solubilizadora de P a partir de roca fosfórica, con medio National Botanical Research Institute phosphate growth médium (NBRIP) sólido, mediante el cálculo y clasificación de índices de solubilización (IS); cuantificación de P solubilizado con el test de fosfato HI 38061 HANNA®; y detección de ácidos orgánicos mediante cromatografía en capa fina (CCF) con medio NBRIP líquido. Asimismo, se determinó la capacidad de las bacterias para solubilizar P en un suelo Andisol durante cinco meses, bajo condiciones de invernadero. Se aplicaron dos inoculaciones (los días 1° y 15° de cada mes), a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml<sup>-1</sup> cada bacteria. Se analizó una vez al mes la cantidad de P disponible en el suelo con solución extractora KCl-OLSEN modificada, así como el pH mediante potenciometría en agua y cloruro de potasio (KCl). Las pruebas de estría cruzada evidenciaron que las bacterias fueron compatibles entre sí en las diferentes combinaciones. Con la evaluación cualitativa se demostró que las tres bacterias solubilizaron P a partir de roca fosfórica, ya que éstas formaron distintos halos de solubilización; <<Pf>> (IS 5.85) y <<St>> (IS 2.28) fueron los tratamientos con mayor y menor capacidad de solubilización, respectivamente. Con el análisis de cuantificación se encontró que las tres bacterias y sus co-inoculaciones también solubilizaron P en medio NBRIP líquido, acompañado de un descenso en el pH del medio; <<Pf>> (16.13 mg/l P; pH 4.85) y <<Pf+B<sub>s</sub>+St>> (15.80 mg/l P; pH 4.74) fueron los tratamientos con mayor solubilización de P. Sin embargo, no se detectó la presencia de ácidos orgánicos liberados al medio en ningún día de evaluación. Por otro lado, los ensayos en condiciones de invernadero mostraron que ninguna inoculación o co-inoculación aumentó la cantidad de P disponible en el suelo. Se concluye que las bacterias tienen la capacidad de solubilizar P inorgánico a partir de roca fosfórica, y que este proceso podría atribuirse a otros mecanismos y no exclusivamente a la producción de ácidos orgánicos. Además, que éstas bacterias no solubilizaron P en el suelo, posiblemente por condiciones rizosféricas y características edafológicas propias del suelo Andisol evaluado.

**Palabras clave:** ácidos orgánicos, bacterias, pH, solubilización

## ABSTRACT

This study evaluated phosphorus (P) solubilization of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Streptomyces* sp. bacteria, owned by Laboratorio BIOMACA®, as a potential microorganisms that allow plants to have a greater amount of available P. The following tests were carried out under *in vitro* conditions: antagonism tests with cross-streak technique, to discard incompatibility between each other; qualitative evaluation of the capacity to solubilize P from rock phosphate with NBRIP solid medium, through determination and classification of solubilization index (SI); quantification of solubilized P with HI 38061 HANNA® phosphate test; and detection of organic acids by thin layer chromatography (TLC) with NBRIP liquid medium. In addition, capacity of bacteria to solubilize P in an Andisol soil was tested during five months, under greenhouse conditions. Two inoculations were applied per month at a concentration of  $1 \times 10^8$  CFU/ml<sup>-1</sup> of each bacteria. Amount of available P was determined once a month with modified KCl-OLSEN extractor solution, as well as pH with water and potassium chloride (KCl) method. Cross-streak tests showed that strains were not antagonistic between each other in any of the combinations. Qualitative evaluation with NBRIP solid medium demonstrated that the three bacteria solubilized P from rock phosphate, since they all formed different solubilization halos; <<Pf>> (SI 5.85) and <<St>> (SI 2.28) were the treatments with the highest and lowest solubilization capacity, respectively. Quantification analysis revealed that the three bacteria and their co-inoculations also solubilized P in NBRIP liquid medium, and this was followed by a decrease in the pH of the medium; <<Pf>> (16.13 mg/l P; pH 4.85) and <<Pf+Bs+St>> (15.80 mg/l P; pH 4.74) were the treatments with highest solubilization. Nevertheless, organic acids released into the medium were not detected in none of the evaluation days. On the other hand, greenhouse trials showed that neither inoculation nor co-inoculation increased the amount of available P in the soil. It is concluded that the three bacteria possess the capacity to solubilize inorganic P from rock phosphate, and this process could be due to other mechanisms and not exclusively to organic acids production. Also, that none of the three bacteria were able to solubilize P in the soil due to rhizosphere conditions and soil properties inherent to the Andisol soil evaluated.

**Keywords:** organic acids, bacteria, pH, solubilization

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Objetivo general .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>3</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1. Importancia del P .....</b>	<b>4</b>
<b>3.2. Disponibilidad de P en el suelo.....</b>	<b>5</b>
<b>3.3. Ciclo y transformaciones del P.....</b>	<b>6</b>
<b>3.4. Formas de P en el suelo .....</b>	<b>7</b>
<b>3.5. Suelos Andisoles.....</b>	<b>8</b>
<b>3.6. La rizósfera.....</b>	<b>10</b>
<b>3.7. Microorganismos asociados con la solubilización de P .....</b>	<b>12</b>
<b>3.7.1. <i>Bacillus subtilis</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>3.7.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>3.7.3. <i>Streptomyces</i> spp.....</b>	<b>14</b>
<b>3.8. Mecanismos utilizados por los microorganismos para solubilizar P .....</b>	<b>15</b>
<b>3.8.1. Producción de ácidos orgánicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3.8.2. Producción de enzimas.....</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Ubicación de la investigación .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2. Origen de las bacterias evaluadas .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>19</b>

<b>4.4. Evaluación cualitativa de la eficacia de solubilización de P <i>in vitro</i> con medio sólido</b>	<b>20</b>
4.4.1. Determinación de índices de solubilización (IS)	21
4.4.2. Análisis estadístico	22
<b>4.5. Cuantificación de P solubilizado, pH y producción de ácidos orgánicos <i>in vitro</i> con medio líquido</b>	<b>22</b>
4.5.1. Cuantificación de P solubilizado y pH	23
4.5.2. Determinación e identificación de ácidos orgánicos	24
4.5.3. Análisis estadístico	25
<b>4.6. Determinación del grado de solubilización de P en el suelo</b>	<b>26</b>
4.6.1. Extracción y preparación del suelo	26
4.6.2. Siembra de las semillas para el ensayo en condiciones de invernadero	26
4.6.3. Preparación y aplicación de los inóculos	28
4.6.4. Medición del contenido de P disponible y pH del suelo	29
4.6.5. Análisis estadístico	30
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
5.1. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	31
5.2. Evaluación cualitativa de la eficacia de solubilización de P <i>in vitro</i> con medio sólido	32
5.3. Cuantificación de P solubilizado, pH y producción de ácidos orgánicos <i>in vitro</i> con medio líquido	34
5.4. Determinación del grado de solubilización de P en el suelo	37
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
6.1. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	41
6.2. Evaluación cualitativa de la eficacia de solubilización de P <i>in vitro</i> con medio sólido	41
6.3. Cuantificación de P solubilizado, pH y producción de ácidos orgánicos <i>in vitro</i> con medio líquido	43
6.4. Determinación del grado de solubilización de P en el suelo	46
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>50</b>

**8. RECOMENDACIONES** ..... 51

**9. REFERENCIAS** ..... 52

**10. ANEXOS** ..... 70

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos utilizados para evaluar antagonismo <i>in vitro</i> con prueba de estría cruzada..	19
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos utilizados para evaluar la solubilización de P con medio NBRIP sólido.....	21
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos utilizados para cuantificar el P solubilizado, pH y producción de ácidos orgánicos con medio NBRIP líquido.....	23
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos utilizados para evaluar la solubilización de P en el suelo .....	29
<b>Tabla 5.</b> Índices de solubilización y capacidad de los tratamientos para solubilizar P en medio NBRIP sólido .....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación satelital de la FESL .....	18
<b>Figura 2.</b> Medición de diámetros para determinar índices de solubilización .....	22
<b>Figura 3.</b> Análisis de propiedades químicas del suelo Andisol evaluado.....	27
<b>Figura 4.</b> Análisis de propiedades físicas del suelo Andisol evaluado.....	27
<b>Figura 5.</b> Pruebas de antagonismo con técnica de estría cruzada .....	31
<b>Figura 6.</b> Halos traslúcidos de solubilización de P formados por las bacterias al 1° y 7° día de incubación .....	32
<b>Figura 7.</b> Solubilización de P (mg/l) y comportamiento del pH en medio NBRIP líquido durante cinco días de incubación.....	35
<b>Figura 8.</b> Cromatograma en capa fina de ácidos orgánicos producidos por las bacterias en medio NBRIP líquido, al final del período de incubación (5d).....	37
<b>Figura 9.</b> Cambio en la concentración de P disponible (mg/l) en el suelo, en función de la inoculación bacteriana, durante cinco meses (M) de evaluación.....	38
<b>Figura 10.</b> Efecto de los tratamientos en el pH del suelo durante los cinco meses (M) de evaluación .....	39

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Prueba de antagonismo mediante técnica de estría cruzada .....	70
<b>Anexo 2.</b> Cálculos para determinar la necesidad de fertilización .....	71
<b>Anexo 3.</b> Cálculos para obtener dosis de inoculación a aplicar mediante técnica de dilución en placa .....	72
<b>Anexo 4.</b> Tabla de correlaciones de Pearson ( $p < 0.05$ ) entre la cantidad de P solubilizado y el pH en medio NBRIP líquido en los cinco días (5d) de evaluación .....	73
<b>Anexo 5.</b> ANOVA de mediciones repetidas en el tiempo para la concentración de P en el suelo ....	73
<b>Anexo 6.</b> ANOVA de mediciones repetidas en el tiempo para el pH del suelo .....	75
<b>Anexo 7.</b> Tabla de correlaciones de Pearson ( $p < 0.05$ ) entre el cambio en la concentración de P disponible y el pH en el suelo .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**Al<sup>3+</sup>:** aluminio elemental

**ANOVA:** análisis de varianza

**ARN:** ácido ribonucleico

**ATM:** atmósferas de presión

**ATP:** trifosfato de adenosina

**BaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O:** cloruro de bario di hidratado

**°C:** grados Celsius

**C:** carbono elemental

**Ca<sup>2+</sup>:** calcio elemental

**CIA:** Centro de Investigaciones Agronómicas

**cm:** centímetros

**cm<sup>3</sup>:** centímetro cúbico

**d:** días

**DCA:** diseño completamente aleatorizado

**ECA:** Escuela de Ciencias Agrarias

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**Fe<sup>3+</sup>:** hierro elemental

**FESL:** Finca Experimental Santa Lucía

**FIA:** analizador por inyección de flujo

**g:** gramos

**h:** horas

**ha:** hectárea

**H<sup>+</sup>**: iones hidrógeno

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: ácido sulfúrico

**HCl**: ácido clorhídrico

**[H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>**: ortofosfato monovalente

**[HPO<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>**: ortofosfato divalente

**IS**: índice de solubilización

**K**: potasio elemental

**KCl**: cloruro de potasio

**kg**: kilogramos

**L**: litros

**LAFIT**: Laboratorio de Fitoquímica

**m**: metros

**mg**: miligramos

**Mg<sup>2+</sup>**: magnesio elemental

**MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O**: cloruro de magnesio hexahidrato

**MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O**: sulfato de magnesio heptahidratado

**min**: minutos

**ml**: mililitros

**mm**: milímetros

**mmol**: milimoles

**Mn<sup>2+</sup>**: manganeso elemental

**MSP**: microorganismos solubilizadores de fósforo

**N**: nitrógeno elemental

**NaHCO<sub>3</sub>**: bicarbonato de sodio

**NaOH**: hidróxido de sodio

**NBRIP:** National Botanical Research Institute Phosphate growth medium

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** sulfato de amonio

**nm:** nanómetros

**P:** fósforo elemental

**PD:** papa-dextrosa

**PDA:** papa-dextrosa-agar

**PGPR:** plant growth promoting rhizobacteria

**pH:** potencial de hidrógeno

**pKa:** constante de disociación

**psi:** pulgadas de presión

**PSM:** phosphorus solubilizing microorganisms

**R<sub>t</sub>:** tiempo de retención

**rpm:** revoluciones por minuto

**TLC:** thin layer chromatography

**UFC:** unidades formadoras de colonias

**UCR:** Universidad de Costa Rica

**µg:** microgramos

**µl:** microlitros

**µM:** micromoles

**UNA:** Universidad Nacional

## 1. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para las plantas, necesario para funciones como: la división celular, la fotosíntesis, la transferencia genética y la absorción de nutrientes (Corrales-Ramírez, Arévalo-Gálvez y Moreno-Burbano, 2014; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018). Debido a su importancia, una deficiencia de este elemento en las plantas afecta todas sus etapas fenológicas, desde la germinación hasta la maduración de los frutos, disminuyendo la productividad de los cultivos (Echeverri-Echeverri, 2018; Malhotra, Vandana, Sharma y Pandey, 2018).

El contenido total de este elemento en el suelo está constituido tanto por formas orgánicas como inorgánicas; y, aunque es abundante, la concentración absorbible para las plantas y los microorganismos es muy reducida, debido a reacciones que se rigen por el pH y el tipo de suelo (Sano y Nagata, 2008; Rooney y Clipson, 2009). Tal es el caso de suelos del orden Andisol -que en Costa Rica representan alrededor de 15,9% de las tierras agrícolas- los cuales, aunque poseen características fisicoquímicas aptas para varios cultivos, generalmente son suelos ácidos, capaces de retener hasta el doble de la cantidad de P en comparación con otros órdenes de suelo, debido a la gran capacidad de fijación de sus arcillas tipo alófanas (Alvarado, 2001; Salazar-Porras, 2015; Serna-Posso, 2015).

Para contrarrestar la deficiencia de P en los suelos Andisoles se recurre a la aplicación de fertilizantes químicos (Echeverri-Echeverri, 2018; Kafle et al., 2019; Patiño-Torres, 2010). Sin embargo, una vez que son adicionados al suelo, hasta un 80,0% puede ser fijado rápidamente por la alófana y cationes metálicos, quedando inaccesible para su absorción por las plantas (Acosta-Suárez et al., 2019; Fernández, 2007). Esta situación no solo aumenta los costos de producción, sino que se contamina el recurso hídrico por eutrofización y se puede alterar el equilibrio microbiológico del suelo (Alori, Glick y Babalola, 2017; Banerjee, Palit, Sengupta y Standing, 2010; Miransari, 2013).

La agricultura alternativa, aplicada a la práctica de fertilización, representa una estrategia efectiva para abordar la deficiencia de P en suelos agrícolas, de una manera sostenible (Ben Farhat, Boukhris y Chouayekh, 2015; Gutiérrez-Calvo, 2019). Una de esas estrategias consiste en el uso de microorganismos solubilizadores de fósforo (MSP) (*PSM*, por sus siglas en inglés), los cuales pueden aplicarse como biofertilizantes complementarios a la fertilización fosfórica, permitiendo a las plantas disponer de una mayor cantidad de P asimilable (Beltrán-Pineda, 2014; Moreno-Reséndez, García-Mendoza, Reyes-Castillo, Vásquez-Arroyo y Cano-Ríos, 2018; Rafique, Sultan, Ortas y Chaudhary, 2017).

En lo que respecta a los MSP, estudios han demostrado que bacterias de los géneros *Bacillus* Cohn 1872, *Pseudomonas* Migula 1894 y *Streptomyces* Waksman & Henrici 1943, han sido capaces de solubilizar diversas formas de P inorgánico y orgánico en condiciones *in vitro*, debido a la producción de ácidos orgánicos e hidrólisis enzimática, respectivamente (Corrales-Ramírez et al., 2014; Satyaprakash, Nikitha, Reddi, Sadhana y Satya Vani, 2017; Sharma, Sayyed, Trivedi y Gobi, 2013). Asimismo, investigaciones realizadas en condiciones de invernadero, han reportado un efecto sobre la cantidad de P del suelo, luego de aplicar inoculaciones bacterianas. Vahedi, Rasouli-Sadaghiani, Barin y Vetukuri (2022), reportaron un aumento en la concentración de P disponible de 3,47 mg/kg<sup>-1</sup>. Asimismo, Rosa et al. (2020) obtuvieron incrementos de 5,0 y 6,9 mg de P en el suelo, al inocular *Azospirillum brasilense* con *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente.

Por lo tanto, teniendo en consideración el problema que representa para la producción agrícola la disponibilidad de P en el suelo, es importante la búsqueda e implementación de alternativas sostenibles, que ayuden a hacer este nutriente más disponible para las plantas. Una de estas opciones es la solubilización microbiana de nutrientes, la cual ha sido ampliamente documentada en diversos géneros de MSP (Alori et al., 2017). Por esta razón, en este estudio se evaluó la solubilización de P de las bacterias *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *Streptomyces* sp. a través de ensayos *in vitro*, así como su capacidad para aumentar la concentración de P disponible en un suelo Andisol, bajo condiciones de invernadero.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces* sp. sobre la solubilización de fósforo en condiciones *in vitro* y de invernadero, para su potencial uso en la formulación de biofertilizantes.

### 2.2. Objetivos específicos

- Demostrar cualitativamente la capacidad de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces* sp. para solubilizar fósforo en condiciones *in vitro*.
- Cuantificar la solubilización de fósforo *in vitro* de las bacterias *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces* sp.
- Comprobar la liberación de ácidos orgánicos mediante cromatografía en capa fina (CCF).
- Determinar el grado de solubilización de fósforo en el suelo ejercido por *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces* sp. en condiciones de invernadero.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Importancia del P

El P es uno de los macronutrientes vitales más requeridos por los seres vivos, ya que su función no puede ser sustituida por otro elemento (Krishnaraj y Dahale, 2014; Sánchez-Pérez, Ruíz-Chután, Berdúo-Sandoval, Gaitán-Fernández y Sacbajá-Galindo, 2020; Tapia-Torres y García-Oliva, 2013). Por ejemplo, en el micelio de los hongos, en las células bacterianas y en las plantas, el P puede representar entre 0.5-1.0, 1.5-2.5 y 0.2-0.8% de su peso seco, respectivamente (Beltrán-Pineda, 2014; Sharma et al., 2013). Para la producción agrícola, el P es después del nitrógeno (N), el elemento que más limita el desarrollo y productividad de los cultivos, debido a su relevancia en cuanto a función y requerimiento por las plantas (Satyaprakash et al., 2017; Sharma et al., 2013).

A nivel celular, el P cumple roles esenciales. Como forma parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), es de importancia en los procesos genéticos y síntesis de proteínas. Al ser componente de los fosfolípidos, participa en el mantenimiento de la estructura y balance osmótico de las membranas biológicas. Asimismo, al conformar la molécula energética trifosfato de adenosina (ATP), lleva a cabo reacciones bioquímicas que requieren de la generación y transferencia de energía como el metabolismo de carbohidratos, transporte y absorción de nutrientes, glucólisis, división celular, fotosíntesis, respiración celular y fijación de N (Fernández, 2007; Kafle et al., 2019; Niu et al., 2013; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018; Sashidhar y Podile, 2010; Serna-Posso, 2015).

Morfológicamente, el P desempeña funciones importantes en todas las etapas fenológicas que repercuten en el rendimiento de los cultivos. Por ejemplo, lleva a cabo la germinación y formación de las semillas, el desarrollo radicular y la formación de nódulos, la maduración de los frutos, la floración y la resistencia a los patógenos (Malhotra et al., 2018; Satyaprakash et al., 2017; Sharma et al., 2013).

Por lo general, cuando una planta tiene una deficiencia de P durante la etapa de crecimiento es difícil de diagnosticar, ya que los síntomas pueden no manifestarse o confundirse con los de una deficiencia de N (Fernández, 2007; Malhotra et al., 2018). Sin embargo, los síntomas se evidencian principalmente en los tejidos inferiores más longevos, ya que el P al ser muy móvil dentro de la planta, es transportado a los tejidos más jóvenes que son los que más lo demandan (Fernández, 2007; Krishnaraj y Dahale, 2014; Serna-Posso, 2015).

La deficiencia de P en las plantas afecta la formación y germinación de las semillas; reduce el volumen y arquitectura radicular; disminuye la rigidez y el alargamiento de los tallos, generando plantas pequeñas; y reduce el número y tamaño de las hojas, las más longevas adquieren un color púrpura, debido a que los carbonos necesarios para generar azúcares son desviados para producir antocianinas (Fernández, 2007; Serna-Posso, 2015).

### **3.2. Disponibilidad de P en el suelo**

Aunque los suelos agrícolas contienen grandes reservas de P total, la concentración absorbible representa <1%, casi diez veces menos que la requerida por las plantas (Hinsinger, 2001; Pierzynski, McDowell y Sims, 2005; Sano y Nagata, 2008). Esta baja disponibilidad se debe al agotamiento de los depósitos minerales que impide su reposición natural, a su alta retención (reactividad) por la fracción coloidal y su baja movilidad en el suelo (Beltrán-Pineda, 2014; Echeverri-Echeverri, 2018).

Las formas de P que las raíces y los microorganismos absorben son los ortofosfatos monovalentes  $[H_2PO_4]^-$  y divalentes  $[HPO_4]^{2-}$ , los cuales están en concentraciones bajas en la solución del suelo (De Souza, Ambrosini y Passaglia, 2015; Fernández y Rodríguez, 2005). Al ser absorbidas, ambas formas son trasladadas por proteínas transportadoras de la membrana celular y se almacenan en igual concentración en el citoplasma, mientras que en las vacuolas y el apoplasto se acumula principalmente la forma divalente (Echeverri-Echeverri, 2018; Schachtman, Reid y Ayling, 1998).

El pH determina la especie de ortofosfato que predomina; en suelos alcalinos ( $pH > 7$ ) se absorberá la forma divalente, y en suelos ácidos ( $pH < 6$ ) la forma monovalente (Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010; Satyaprakash et al., 2017; Sharma et al., 2013). No obstante, para cualquier tipo de suelo, la mayor disponibilidad ocurre con un pH entre 6.0 y 7.0, absorbiéndose exclusivamente como forma monovalente (Echeverri-Echeverri, 2018; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018).

En el suelo, los ortofosfatos sufren oclusiones con grupos funcionales de carga positiva como silanol (arcillas), carboxilo (materia orgánica) e hidroxilo (óxidos metálicos), debido a que poseen cargas negativas muy reactivas (Hinsinger, 2001). Así, en suelos ácidos son retenidos por  $Fe^{3+}$  y  $Al^{3+}$  formando minerales insolubles como strengita y variscita, mientras que en suelos alcalinos son retenidos por  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  formando apatitas (Fernández, 2007; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018; Serna-Posso, 2015). Estos minerales luego pueden liberar los ortofosfatos según el pH del suelo, ya que cuando este aumenta se solubilizan los fosfatos de hierro y aluminio, y al disminuir se solubilizan más los fosfatos de calcio (Hinsinger, 2001; Patiño-Torres, 2010).

Debido a la poca disponibilidad de P en el suelo, en la producción agrícola se recurre al uso de fertilizantes químicos para mantener la productividad (Fernández, 2007; Oteino et al., 2015). Sin embargo, la eficiencia de aplicación es baja y la cantidad de P disponible puede alcanzar concentraciones iguales a las de antes de fertilizar, ya que en el primer año, aproximadamente solo un 50% sería absorbido debido a su fijación (Hasan, Hasan, Teixeira Da Silva y Li, 2016; Sharma et al., 2013). Además, el uso constante de estos insumos no solo aumenta los costos de producción, sino que se agotan las reservas naturales, puede afectar la microbiología del suelo y su escorrentía causa eutrofización del agua (Corrales-Ramírez et al., 2014; Gutiérrez-Calvo, 2019; Sharma et al., 2013).

### **3.3. Ciclo y transformaciones del P**

Las reservas naturales de P (0.1% de la litósfera) son finitas, ya que a diferencia de elementos como el N, éste no tiene intercambios con la atmósfera, debido a que no posee un componente gaseoso como entrada (Krishnaraj y Dahale, 2014; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018; Satyaprakash et al., 2017). El ciclo del P experimenta procesos de transformación que incrementan la disponibilidad (desorción-disolución-mineralización), y procesos que la disminuyen (adsorción-precipitación-inmovilización); todos pueden ocurrir simultáneamente en el suelo (Hyland et al., 2005).

La adsorción ocurre cuando el P en la solución del suelo pasa a la fase sólida por intercambio de ligando, interacción electrostática entre la carga negativa de los ortofosfatos con las cargas positivas de arcillas, óxidos metálicos y materia orgánica (Echeverri-Echeverri, 2018; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018). El proceso inverso, la desorción, libera los ortofosfatos sorbidos de los sitios de menor energía y luego de los de mayor energía (Beltrán-Pineda, 2014; Monteiro, 2005). La adsorción es una reacción inicial rápida que prosigue con otras más lentas; la desorción ocurre a una tasa mucho más lenta que la adsorción (Monteiro, 2005; Pierzynski et al., 2005). El tipo de coloides adsorbentes, el potencial redox y la capacidad buffer, el contenido de alófana y el nivel de fertilización son algunos factores que rigen estos procesos (Monteiro, 2005; Pierzynski et al., 2005; Safari-Sinegani y Sedri, 2011).

La precipitación es una transformación más permanente del P que la sorción y sucede cuando los ortofosfatos forman minerales secundarios amorfos que con el tiempo llegan a ser cristalinos y más insolubles como strengita, vivianita, variscita en suelos ácidos y fosfatos de calcio y apatitas en suelos alcalinos (Pierzynski et al., 2005; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018; Sánchez-Pérez et al., 2020). El proceso inverso, la disolución, ocurre cuando el compuesto menos soluble de estos

minerales secundarios se va desagregando por meteorización y pasa a la solución del suelo (Monteiro, 2005; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018; Safari-Sinegani y Sedri, 2011). El equilibrio entre ambos procesos -que depende el pH y la concentración de P- puede no ocurrir, debido a la remoción constante del P soluble por absorción, escorrentía, aplicación de fertilizantes y la mineralización (Hinsinger, 2001; Hocking, 2001; Pierzynski et al., 2005).

La inmovilización ocurre cuando la materia orgánica no supe la demanda fisiológica de P de los microorganismos, por lo que los ortofosfatos de la solución son absorbidos por la biomasa microbiana y son transformados en P orgánico lábil no disponible (Beltrán-Pineda, 2014; Patiño-Torres, 2010; Richardson y Simpson, 2011). En contraparte, la mineralización es cuando se degrada la materia orgánica mediante acidificación, quelación, reacciones de intercambio, producción de ácidos orgánicos e hidrólisis enzimática y el P orgánico pasa a la solución como ortofosfatos absorbibles (Patiño-Torres, 2010; Restrepo-Franco et al., 2015; Yauyo-Landeo, 2015). Ambos procesos pueden ocurrir simultáneamente en el suelo y dependen de factores como: el tipo y cantidad de microorganismos, la cantidad de P orgánico total, las relaciones C:P y N:P de la materia orgánica, la temperatura, la humedad, la aireación, el pH y los exudados radiculares (Aristizábal-Gutiérrez y Cerón-Rincón, 2012; Echeverri-Echeverri, 2018).

### **3.4. Formas de P en el suelo**

En el suelo existen dos tipos de P que difieren en su comportamiento, cantidad y estructura: el inorgánico del depósito mineral y el orgánico del depósito biológico (Echeverri-Echeverri, 2018; Serna-Posso, 2015; Tapia-Torres y García-Oliva, 2016). Ambas formas están presentes, dependiendo de factores como: transformación del material parental, pH y tipo de suelo, textura, materia orgánica y actividad microbiana, y el nivel de fertilización (Patiño-Torres, 2010; Rooney y Clipson, 2009).

El P inorgánico puede representar hasta 70% del P total. Proviene de la meteorización y solubilización de minerales primarios como apatitas-strengita-variscita y secundarios como óxidos de hierro, aluminio y carbonatos de calcio (Beltrán-Pineda, 2014; Echeverri-Echeverri, 2018; Patiño-Torres, 2010). Este depósito se compone de hasta 170 formas minerales reactivas, y pueden estar absorbibles como sales en la solución o inaccesibles en los coloides de la fase sólida, cuya solubilidad se rige según el pH y tipo de suelo (Hocking, 2001; Pierzynski et al., 2005; Rooney y Clipson, 2009).

El P orgánico representa un 20-80% del P total y es la fuente alternativa absorbible cuando la fracción inorgánica no supe la demanda (Patiño-Torres, 2010; Tapia-Torres y García-Oliva, 2013; Sano y Nagata, 2008). Proviene de la mineralización de materia orgánica, generando fosfatos de inositol como fitato (50-80%), ésteres de fosfato como ácidos nucleicos (<3%) y fosfolípidos (7%) (Aristizábal-Gutiérrez y Cerón-Rincón, 2012; Patiño-Torres, 2010; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018). El fitato es de difícil mineralización y las plantas no pueden absorberlo directamente, ya que por su carga negativa se une fuertemente a óxidos férricos, ácidos húmicos y fúlvicos (Aristizábal-Gutiérrez y Cerón-Rincón, 2012; Beltrán-Pineda, 2014; Sharma et al., 2013). Los ésteres de fosfato son una fracción mucho menor, pero son más solubles y mineralizables, debido a que sus enlaces son más fáciles de hidrolizar (Patiño-Torres, 2010; Tapia-Torres y García-Oliva, 2013).

Para saber cuáles procesos están involucrados en la disponibilidad del P para las plantas y los microorganismos en determinado momento, es necesario determinar en qué depósito (orgánico o inorgánico) y grado de estabilización (lábil o no lábil) se encuentra (Sánchez-Pérez et al., 2020; Tapia-Torres y García-Oliva, 2013). Las formas lábiles están débilmente unidas a la fase sólida y son fácilmente mineralizables, supliendo a la solución de ortofosfatos rápidamente; las formas no lábiles u ocluidas son minerales inaccesibles, ya que no están en equilibrio con la solución, debido a la estabilidad de su unión (Echeverri-Echeverri, 2018; Pierzynski et al., 2005; Swain, Laxminarayana y Ray, 2012). Ambas formas pueden coexistir en el suelo y puede haber conversiones de un grado a otro, ya que los índices de disolución y precipitación son diferentes (Serna-Posso, 2015).

### **3.5. Suelos Andisoles**

El orden Andisol está constituido por suelos formados mediante meteorización y depósitos de cenizas volcánicas, e incluye subórdenes que ocupan los diferentes estratos del relieve volcánico como Vitrandis, Ustandis, Haplustandis y Melanudandis (Alvarado, 2001; Salazar-Porras, 2015). En Costa Rica, parte de estos suelos son utilizados para la producción agrícola y representan alrededor de un 15.9% del territorio nacional, distribuidos en las faldas volcánicas del Valle Central, Cordillera de Guanacaste, la Zona Sur y zonas del Atlántico y Norte (Alvarado, 2001; Salazar-Porras, 2015).

Las características edafológicas de los suelos Andisoles varían con la altimetría sobre el nivel del mar, ya que esta determina el grado de meteorización y los procesos de mineralización que repercuten en la formación de sus diferentes tipos de arcilla (Alvarado, 2001). Generalmente, tienen características químicas como: fertilidad media-baja, pH ácido (5-6), acidez intercambiable moderada,

capacidad de intercambio aniónico y de bases bajo, alto contenido de materia orgánica (>20%, pero su mineralización es muy lenta, debido a que la alófana reacciona con sus grupos funcionales) y bajo contenido de P (hasta 60% puede estar en forma orgánica) (Alvarado, 2001; Cisneros-Rojas, Sánchez de Prager y Menjivar-Flores, 2017; Echeverri-Echeverri, 2018). Además, por sus características físicas tienen buena estructura, alta porosidad total y velocidad de infiltración, así como una baja densidad aparente (Alvarado, 2001; Salazar-Porras, 2015).

De acuerdo con su mineralogía, los suelos Andisoles pueden dividirse en: cenizas volcánicas recién depositadas; suelos jóvenes, en los que predomina la alófana; y suelos desarrollados, compuestos de haloisita mezclada con alófana (Alvarado, 2001). Asimismo, su textura varía según el estrato volcánico, ya que en regiones aledañas son franco-arenosos, en regiones intermedias son franco-limosos o francos y en las secciones más bajas son arcillosos, siendo que conforme más fina es su textura mayor es la fijación de nutrientes (Salazar-Porras, 2015).

Los suelos Andisoles tienen dos problemáticas para su uso agrícola: su acidez y una alta fijación de P, de hasta un 95% (Echeverri-Echeverri, 2018; Prieto-Correal, Prada-Salcedo, Cuervo y Franco-Correa, 2015). Ambos procesos están relacionados, ya que la acidez propicia la fijación del P a las arcillas y la materia orgánica, así como la formación de fosfatos de aluminio y de hierro insolubles (Echeverri-Echeverri, 2018; Hinsinger, 2001; Jorquera et al., 2011).

La acidez de los suelos Andisoles se origina por la meteorización, el clima, el relieve, e iones ácidos provenientes de la descomposición de materia orgánica y la remoción de bases Ca, Mg y K por los cultivos (Alvarado, 2001; Hocking, 2001). Esta ocasiona que los óxidos libres de  $Al^{3+}$  y  $Fe^{3+}$  formados por la disolución de fosfatos como strengita y variscita, que poseen carga superficial positiva, y los  $Mn^{2+}$  y  $H^+$  sean más solubles, y por lo tanto, capaces de retener los ortofosfatos (Echeverri-Echeverri, 2018; Hocking, 2001; Monteiro, 2005; Msimbira y Smith, 2020).

Por otra parte, la fijación del P en Andisoles ocurre debido a su adsorción por arcillas de carga variable, baja cristalinidad y con amplia superficie específica como la alófana (un coloide amorfo poco cristalino y muy reactivo, originado por meteorización de materiales piroclásticos y deposiciones volcánicas); y la precipitación por óxidos o complejos húmicos que contienen  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$  y  $Mn^{2+}$  que son estables a pH bajo (Echeverri-Echeverri, 2018; Salazar-Porras, 2015; Sánchez-Pérez et al., 2020). En general, la fijación es menor a mayor altitud debido a texturas gruesas y poca meteorización, mientras que en zonas medias compuestas de alófana y ferrihidrita es mayor (Alvarado, 2001).

Ambas problemáticas ocasionan no solo una deficiencia del P natural, sino que los suelos Andisoles fijan el doble de la cantidad de P adicionada por unidad de área que los suelos calcáreos, disminuyendo la eficiencia de los fertilizantes fosfóricos (Sánchez-Pérez et al., 2020; Serna-Posso, 2015). Además, la acidez puede afectar el crecimiento de la raíz e inhibir la absorción de nutrientes como el N, debido a la toxicidad por  $Al^{3+}$  o  $Mn^{3+}$  (Alvarado, 2001; Msimbira y Smith, 2020).

### **3.6. La rizósfera**

La rizósfera fue definida por Lorentz Hiltner en 1904 para describir la sección del suelo que posee características fisicoquímicas y microbiológicas diferentes a las del resto del suelo, debido a la influencia del sistema radicular (Bakker et al., 2020; Hinsinger, 2001; Prashar, Kapoor y Sachdeva, 2014). Su extensión varía según el tipo de suelo, tipo de planta, las condiciones ambientales y la distancia a la que puedan difundir los exudados radiculares (Maheswar y Sathiyavani, 2012; Prashar et al., 2014; Satyaprakash et al., 2017). Esta se compone de las siguientes secciones:

1. Ectorizósfera; suelo adyacente a la raíz
2. Rizoplano; superficie radicular fuertemente adherida a partículas de suelo y microorganismos e incluye la epidermis, corteza y polisacáridos mucilaginosos
3. Espermósfera; suelo circundante a las semillas en germinación y el primer hábitat de los microorganismos inoculados en las semillas
4. Endorizósfera; tejidos internos de la raíz como la endodermis y capas corticales

Las raíces liberan entre 5 y 60% del C fotosintetizado a la rizósfera en forma de nutrientes, fenómeno denominado por Whipps y Lynch en 1985 como rizodeposición (Bakker et al., 2020; Prashar et al., 2014; Richardson y Simpson, 2011). Este proceso origina los exudados o rizodepósito, conformado por metabolitos como: ácidos orgánicos, aminoácidos, carbohidratos, enzimas, ésteres de fosfato, fitohormonas, gases ( $CO_2$ , etileno), sideróforos, mucílago (células de la cofia y pelos radiculares desprendidos) y proteínas (De Souza et al., 2015; Jog, Pandya, Nareshkumar y Rajkumar, 2014; Mendes-Dos Santos, Escobar-Díaz, Bentes-Lobo y Rigobelo, 2020; Prashar et al., 2014).

Los microorganismos están influenciados por la rizodeposición; esto se conoce como <<efecto rizosférico>> (De Souza et al., 2015; Hinsinger, 2001; Satyaprakash et al., 2017). Este proceso varía con el tipo de planta y su estado fenológico, tipo de suelo, humedad, pH, temperatura; y hace que la planta reclute y concentre los microorganismos específicos que requiere en determinado momento,

modulando el tipo y la cantidad de rizodépósito necesario para que estos colonicen y sobrevivan en la rizósfera (Bakker et al., 2020; De Souza et al., 2015; Mendes, Garbeva y Raaijmakers, 2013). Por esta razón, la actividad, diversidad y biomasa microbiana en la rizósfera puede ser hasta 50 veces más que en el resto del suelo (Bakker et al., 2020; Glick, 2012; Prashar et al., 2014).

Debido al efecto rizosférico, la rizósfera alberga mayor diversidad (actinomicetos, bacterias, hongos, virus, protozoos, oomicetos) y cantidad ( $\sim 1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{12}$  UFC/g suelo) de microorganismos que el resto del suelo, dónde pueden haber menos de  $1 \times 10^8$  UFC/g suelo (Echeverri-Echeverri, 2018; Glick, 2012; Prashar et al., 2014; Villareal-Delgado et al., 2017). Las bacterias son las más abundantes (~95%), principalmente las de los filos Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria, siendo las especies *Streptomyces* sp., *B. subtilis* y *P. fluorescens* las más representativas, respectivamente (Glick, 2012; Müller, Vogel, Bai y Vorholt, 2016; Prashar et al., 2014). Éstos microorganismos experimentan relaciones sinérgicas, antagónicas, simbióticas y de competencia, que pueden incidir en el crecimiento de la planta de manera positiva (promover el crecimiento), negativa (patogenicidad), o no tener ningún efecto (Cano, 2011; Glick, 2012; Gutiérrez-Calvo, 2019; Miransari, 2013).

Las especies antes mencionadas son conocidas como *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR), término acuñado por Kloepper y Schroth en 1978 para describir a las bacterias rizosféricas que promueven el crecimiento de las plantas (Álvarez-García, Santoyo y Rocha-Granados, 2020; Prashar et al., 2014). Las PGPR representan un 2-5% del total de bacterias rizosféricas cultivables, y ejercen su acción mediante mecanismos directos, indirectos y/o una combinación de ambos (Mendes-Dos Santos et al., 2020; Moreno-Reséndez et al., 2018; Msimbira y Smith, 2020). Los directos involucran la síntesis de fitohormonas que estimulan la germinación de semillas, el desarrollo radicular y la tolerancia a estreses; y de metabolitos como ácidos orgánicos, enzimas y sideróforos que mejoran la absorción de nutrientes (Cano, 2011; Moreno-Riaño, 2017; Sivasakthi, Kanchana, Usharani y Saranraj, 2013). Por otra parte, los indirectos llevan a cabo el control biológico de plagas y enfermedades mediante antibiosis, alelopatía, lisis enzimática, competencia por espacio y nutrientes, e inducción de resistencia sistémica (Mendes-Dos Santos et al., 2020; Satyaprakash et al., 2017).

Las PGPR como *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *Streptomyces* spp. pueden desplazarse entre los compartimentos de la rizósfera y pasar de un estilo de vida libre o epífita a uno endófito (Müller et al., 2016; Trivedi, Leach, Tringe, Sa y Singh, 2020). Esto ocurre cuando ingresan a la endorizósfera por grietas o por los puntos de emergencia de las raíces y se desplazan por los espacios intercelulares del xilema y las células epidérmicas hasta colonizar los órganos aéreos (Compant, Samad, Faist y

Sessitsch, 2019; De Souza et al., 2015). Debido a esta capacidad, tienen una comunicación más estrecha con la planta, porque sus metabolitos, aún a concentraciones mínimas, promueven el crecimiento de mejor manera, ya que hay una menor competencia por nutrientes, temperaturas más estables y protegidas de condiciones de estrés (Álvarez-García et al., 2020; De Souza et al., 2015).

### **3.7. Microorganismos asociados con la solubilización de P**

#### **3.7.1. *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* (Reino: Bacteria; Filo: Firmicutes; Clase: Bacilli; Orden: Bacillales; Familia: Bacillaceae) fue caracterizada por Ferdinand Cohn en 1872, quién descubrió también su capacidad de esporulación (Maughan y Van der Auwera, 2011). Actualmente, es la especie modelo para el estudio de bacterias Gram positivas formadoras de esporas, y se convirtió en una de las primeras bacterias en ser genómicamente secuenciada (Errington y Van der Aart, 2020; Härtig y Jahn, 2012).

Desde su descubrimiento, *B. subtilis* ha sido una de las bacterias más abundantes en la rizósfera respecto a otros géneros bacterianos. Esta mención, aunque se atribuye en parte a su versatilidad metabólica y su estilo de vida saprófito que le permite utilizar gran variedad de moléculas orgánicas en el suelo, se debe principalmente a su capacidad para formar biopelículas y esporas, las cuales garantizan su dispersión, alta proliferación y sobrevivencia en el suelo (Errington y Van der Aart, 2020; Tejera-Hernández, Rojas-Badía y Heydrich-Pérez, 2011; Villareal-Delgado et al., 2017).

Entre las características fisiológicas y morfológicas de *B. subtilis* destacan: es Gram positiva; estrictamente aerobia o anaerobia facultativa; saprófita y con nutrición quimiorganótrofa; necesita un pH entre 5.5-8.5 para su óptimo crecimiento; es mesófila (temperatura ideal entre 28-30 °C); posee flagelos para desplazarse y además de producir esporas y biopelículas puede vivir como endófito (Errington y Van der Aart, 2020; Harwood, Pohl, Smith y Wipat, 2013; Tejera-Hernández et al., 2011; Villareal-Delgado et al., 2017).

Se estima que ~5% del genoma de *B. subtilis* está destinado a su ciclo de vida, el cual consta de dos fases: la primera, un crecimiento vegetativo en el que se reproduce mediante fisión binaria, cuando dispone de condiciones ambientales favorables; y la segunda, una fase de esporulación en la cual se generan las esporas cuando imperan condiciones de estrés biótico o abiótico, las cuales permanecen en latencia, para luego dar paso nuevamente al crecimiento vegetativo (Errington y Van der Aart, 2020; Harwood et al., 2013; Tejera-Hernández et al., 2011; Villareal-Delgado et al., 2017).

Durante los últimos años se ha dilucidado la gran diversidad metabólica de *B. subtilis*. Es así como se le han atribuido múltiples actividades promotoras del crecimiento, como la disminución de los efectos deletéreos causados por patógenos y la secreción de metabolitos (sideróforos, ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos) para aumentar la disponibilidad de nutrientes como el P; incluso, se estima que cerca del 4% de su genoma está destinado a la producción de éstos metabolitos (Sivasakthi et al., 2013; Tejera-Hernández et al., 2011; Villareal-Delgado et al., 2017).

### 3.7.2. *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* (Reino: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Clase: Gammaproteobacteria; Orden: Pseudomonadales; Familia: Pseudomonadaceae) es una bacteria cuyo género fue descrito en 1894 por Walter Migula (Paz-Zarza et al., 2019; Peix, Ramírez-Bahena y Velázquez, 2018). Su nombre deriva de la presencia de falsas unidades que actúan como materiales de reserva, y la formación de pigmentos como pioverdinas, que al irradiarse con luz ultravioleta producen fluorescencia (Andreani et al., 2014; Mamani-Herrada, 2017; Seaton y Silby, 2014).

Entre las características fisiológicas y morfológicas de *P. fluorescens* destacan: es Gram negativa; de metabolismo estrictamente aerobio; mesófila (25-30 °C); con crecimiento óptimo a pH neutro (7); dispone de flagelos para movilizarse; saprófita de nutrición quimiorganótrofa; vive en la rizósfera o como endófito; y no produce esporas (Álvarez-García et al., 2020; Kumar, Franzetti, Kaushal y Kumar, 2019; Scales, Dickson, LiPuma y Huffnagle, 2014; Seaton y Silby, 2014).

Respecto al ciclo de vida de *P. fluorescens*, ésta se reproduce rápidamente mediante fisión binaria, proceso en el que se replica originando dos células genéticamente iguales a la célula parental. Asimismo, aunque su ciclo de vida no contempla la formación de esporas, involucra la formación de biopelículas como método de sobrevivencia y para obtener una ventaja competitiva de crecimiento y colonización, persistentes en hábitats como la rizósfera (Baum et al., 2009; Kumar et al., 2019; Meliani y Bensoltane, 2015; Scales et al., 2014).

Por otra parte, la presencia de *P. fluorescens* en la rizósfera le ha valido ser reconocida como un PGPR, gracias a sus mecanismos directos (solubilización de nutrientes como el P, en especial mediante la producción de sideróforos) e indirectos (control de enfermedades por inducción de resistencia sistémica y antibiosis), que le confieren también una mayor habilidad para competir con la demás microflora presente (Garrido-Sanz et al., 2017; Mamani-Herrada, 2017; Scales et al., 2014).

### 3.7.3. *Streptomyces* spp.

*Streptomyces* spp. (Reino: Bacteria; Filo: Actinobacteria; Clase: Actinobacteria; Orden: Actinomycetales; Familia: Streptomycetaceae) es una bacteria cuyo género fue descrito por primera vez en 1943 por Waksman y Henrici (Anderson y Wellington, 2001; Hasani, Kariminik y Issazadeh, 2014). Ésta se caracteriza porque, a pesar de ser bacteria, tiene estructuras filamentosas similar a la de los hongos (hifas), así como por su producción de metabolitos -60-80% de antibióticos de uso médico- como la geosmina, compuesto volátil que da el olor característico a suelo mojado (De Lima Procópio, Da Silva, Martins, De Azevedo y De Araújo, 2012; Gopalakrishnan, Srinivas y Prasanna, 2020; Hasani et al., 2014; Sharma, Sharma, Malannavar y Salwan, 2020).

Algunas características fisiológicas y morfológicas importantes de *Streptomyces* spp. son: es Gram positiva; con estilo de vida saprófito; no tiene motilidad; de metabolismo aerobio quimiorganótrofa; mesófila (25-35 °C); con un pH óptimo de crecimiento entre 6.5-8.0; puede vivir como endófito y sus micelios (vegetativo y aéreo) contienen esporoforos, cadenas de artrosporas no móviles de diversos colores para dispersarse y sobrevivir en la rizósfera, las cuales pueden mantenerse en latencia (Briceño, Fuentes, Sáez, Díez y Benimeli, 2018; Quinn, Banat, Abdelhameed y Banat, 2020; Sharma et al., 2020).

Respecto al ciclo de vida de *Streptomyces* spp., este consta de cuatro fases: la primera, inicia con la germinación de las esporas; la segunda, es la conversión de las esporas en hifas vegetativas; la tercera, es el desarrollo de las hifas aéreas (esporoforos); y la cuarta, culmina con la diferenciación de las hifas aéreas en cadenas de esporas, que se dispersan e inician nuevamente el ciclo (Briceño et al., 2018; Chater, 2006; Hasani et al., 2014). Además, recientemente se descubrió que *Streptomyces* spp. puede emplear un <<crecimiento exploratorio>>, como medio para compensar su falta de motilidad y poder dispersarse para acceder a nutrientes (Jones y Elliot, 2017).

Agronómicamente, *Streptomyces* spp. actúa en el reciclaje de materia orgánica y la promoción del crecimiento, mediante sideróforos y antibióticos (De Lima Procópio et al., 2012; Gopalakrishnan et al., 2020; Sharma et al., 2020). Además, estudios han dilucidado su capacidad para solubilizar P; incluso, se ha sugerido el uso de roca fosfórica con esporas de *Streptomyces* para mejorar la absorción de P por las plantas (Ben Farhat et al., 2015; Chaiharn, Pathom-aree, Sujada y Lumyong, 2018).

### 3.8. Mecanismos utilizados por los microorganismos para solubilizar P

#### 3.8.1. Producción de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son moléculas de bajo peso molecular, provenientes del metabolismo de azúcares (carbohidratos, lípidos) en el Ciclo de Krebs y en la glucólisis (Hinsinger, 2001; Hocking, 2001; Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010; Ström, 1997). Éstos poseen grupos carboxilo de carga negativa y aunque difieren en su número de protones disociables, todos son disociados en el citosol celular como aniones y no como ácidos, debido a que tienen valores de pKa más bajos que el pH neutral del citosol (Hinsinger, 2001; Hocking, 2001; Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010; Yadav, Yadav y Vashistha, 2016).

En 1908, se descubrió su rol en la solubilización de P *in vitro* en cultivos de hongos y bacterias, a los cuales se les ha denominado como *Phosphate Solubilizing Microorganisms* (PSM, por sus siglas en inglés) (Corrales-Ramírez et al., 2014; Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010). En 1980, Gardner et al. encontraron por 1° vez que su exudación por plantas causó una mayor solubilización y absorción de P (Hinsinger, 2001; Hocking, Randall, Delhaize y Keerthisinghe, 2000). En 1980, Christiansen-Weniger et al. evidenciaron su rol contra la toxicidad por Al<sup>3+</sup>, importante porque generalmente coincide con la deficiencia de P en suelos ácidos (Echeverri-Echeverri, 2018; Hocking et al., 2000). Desde entonces, ácidos orgánicos como: cítrico, tartárico, fumárico, glucónico, láctico, málico, oxálico, propiónico, succínico, 2-ketogluconico, etc, se han reportado capaces de solubilizar distintas fuentes de P inorgánico como fosfato dicálcico, tricálcico, rocas fosfóricas, fosfatos de Al y de Fe (Alori et al., 2017; Corrales-Ramírez et al., 2014; Moreno-Reséndez et al., 2018).

En la rizósfera, se estima que los ácidos orgánicos tienen una sobrevivencia de entre 2-12 h y su concentración en la solución del suelo generalmente es muy baja (1-50 µM) (Hinsinger, 2001; Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010). Pueden ser de origen vegetal o microbiano, el tipo y su cantidad varía entre especies de microorganismos y plantas, y de la calidad de los exudados que varían con el tipo y fenología del cultivo, la longevidad de las raíces y las variables ambientales (Hinsinger, 2001; Krishnaraj y Dahale, 2014; Satyaprakash et al., 2017). En todo caso, cualquiera que sea su origen, la capacidad de los ácidos orgánicos para solubilizar P depende del pH, tipo, mineralogía y las formas de P presentes en el suelo (Hocking, 2001; Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010).

Los ácidos orgánicos solubilizan P mediante dos mecanismos: disminuyendo el pH por extrusión de H<sup>+</sup>, que mantiene el equilibrio aniones-cationes para compensar sus cargas negativas y propician un intercambio ácido o de ligando, en el que los H<sup>+</sup> sustituyen los cationes y/o compiten por los sitios de sorción del P; y la quelación, con la cual, los grupos carboxilo forman quelatos por la unión del anión orgánico con los cationes fijadores del P (Hinsinger, 2001; Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018; Serna-Posso, 2015).

Respecto a los anteriores mecanismos, la cantidad de P que puedan liberar depende del tipo y la fuerza del ácido según sus constantes de disociación (pKa), las cuales entre mayor sean, más fuerte es el ácido y más se disocia (Krishnaraj y Dahale, 2014; Serna-Posso, 2015). Además, la solubilización es proporcional a la estabilidad de los compuestos metálicos fijadores de P, ya que los ácidos orgánicos se unen más fuertemente en el orden tricarbónicos > dicarbónicos > monocarbónicos (Fankem et al., 2008; Hocking et al., 2000). Por otra parte, los ácidos que forman anillos estables de 5 o 6 enlaces, así como el número y las posiciones de los grupos OH/COOH en la cadena principal de carbono ofrecen la mayor protección contra la toxicidad por Al<sup>3+</sup> (Hocking et al., 2000; Hocking, 2001).

Debido a que las bacterias tienen varias rutas metabólicas para producir ácidos orgánicos (respiración oxidativa, glucólisis, fermentación, Ciclo de Krebs), se ha hecho imposible tener un consenso sobre el proceso de solubilización del P, contrario a la fijación de N en el cual todas las vías recalcan en el sistema nitrogenasa (Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010). Sin embargo, Liu et al. en 1992 atribuyeron la solubilización de fosfatos de calcio a la oxidación directa de glucosa a ácido glucónico en el espacio periplásmico celular, y fue propuesto por Goldstein en 1996 como el principal mecanismo de solubilización en bacterias Gram negativas (Alori et al., 2017; Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010; Patiño-Torres, 2010). En este proceso -inducido por bajas concentraciones de P y altas concentraciones de glucosa-, la enzima glucosa deshidrogenasa oxida la glucosa en el exterior de la membrana citoplasmática y el ácido producido en la superficie celular acidifica el espacio periplásmico, proporcionando los H<sup>+</sup> y aniones orgánicos que sustituyen los cationes, liberando el P (Beltrán-Pineda, 2014; Oteino et al., 2015; Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010; Patiño-Torres, 2010; Sashidhar y Podile, 2010).

Las bases genéticas de la solubilización de P aún no están claramente establecidas (Moreno-Reséndez et al., 2018). Sin embargo, en 1987 Goldstein y Liu clonaron por primera vez un gen involucrado en la solubilización de P a partir de *Erwinia herbicola*, el cual al transferirlo a *Escherichia coli*, se logró que ésta produjera ácido glucónico y solubilizara hidroxapatita (Patiño-Torres, 2010).

Pese a que se considera que los ácidos orgánicos son el principal mecanismo de solubilización de P, algunos ácidos inorgánicos también se han asociado con dicha capacidad, aunque su efectividad es menor (Kafle et al., 2019; Krishnaraj y Dahale, 2014; Sharma et al., 2013). Entre los ácidos inorgánicos reportados se encuentran: el ácido nítrico, generado por la oxidación de compuestos inorgánicos nitrogenados; el ácido sulfúrico, resultante de la oxidación de compuestos de azufre por bacterias del género *Thiobacillus*; el HCl, capaz de solubilizar hidroxiapatita, y el ácido carbónico (Beltrán-Pineda, 2014; Krishnaraj y Dahale, 2014; Serna-Posso, 2015; Sharma et al., 2013).

### **3.8.2. Producción de enzimas**

El P debe convertirse en ortofosfatos mediante mineralización, a través de enzimas fosfatasas, fitasas y C-P liasas, para que las plantas y microorganismos puedan utilizar el P orgánico (Fernández y Rodríguez, 2005; Moreno-Reséndez et al., 2018; Richardson y Simpson, 2011). Su liberación se favorece con bajos niveles de P y una alta disponibilidad de materia orgánica de fácil asimilación, mientras que fluctuaciones bruscas de temperatura o de pH pueden desnaturalizarlas e interferir su acción biológica (Corrales-Ramírez et al., 2014; Kafle et al., 2019; Richardson y Simpson, 2011).

Las fosfatasas son las enzimas más abundantes en el suelo involucradas en la mineralización del P orgánico (Kafle et al., 2019; Sharma et al., 2013). Estas enzimas no específicas pueden ser extracelulares, e hidrolizar los enlaces éster de los ésteres de fosfato y los enlaces anhídridos de ácido fosfórico; e intracelulares, y traslocar el P de tejidos senescentes (Corrales-Ramírez et al., 2014; Duff, Sarath y Plaxton, 1994; Hasan et al., 2016; Malhotra et al., 2018). Asimismo, según el pH se divide en fosfatasas ácidas y alcalinas; raíces y hongos exudan exclusivamente ácidas, mientras que las bacterias pueden producir tanto ácidas como alcalinas (Duff et al., 1994; Kafle et al., 2019; Patiño-Torres, 2010; Serna-Posso, 2015; Tapia-Torres y García-Oliva, 2013; Yauyo-Landeo, 2015).

Por otra parte, las fitasas hidrolizan fitatos como el ácido fítico, liberando grupos ortofosfato del anillo de inositol (Aristizábal-Gutiérrez y Cerón-Rincón, 2012; Jorquera et al., 2011). Estas se clasifican en: fosfatasas histidinas ácidas (la mayoría), fitasas de cisteína, fosfatasas ácidas púrpura y fitasas  $\beta$ -hélice, que a su vez son extracelulares (producidas por hongos y bacterias Gram positivas) e intracelulares y periplásmicas (producidas por bacterias Gram negativas) (Aristizábal-Gutiérrez y Cerón-Rincón, 2012; Fernández y Rodríguez, 2005; Jorquera et al., 2011). Al igual que las fosfatasas, pueden ser ácidas y alcalinas, y son producidas tanto por las raíces como por los microorganismos (Corrales-Ramírez et al., 2014; Fernández y Rodríguez, 2005; Yauyo-Landeo, 2015).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Ubicación de la investigación

Las evaluaciones en condiciones *in vitro* se hicieron en los laboratorios de Fitopatología Investigación de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA) y de Fitoquímica (LAFIT) de la Escuela de Química en la Universidad Nacional (UNA), Campus Omar Dengo; así como en el Laboratorio de Suelos y Foliar del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) en la Universidad de Costa Rica (UCR). Por otra parte, las pruebas en condiciones de invernadero se realizaron en la Finca Experimental Santa Lucía (FESL) de la ECA ( $10^{\circ}01'22''\text{N}$ ;  $84^{\circ}06'43''\text{W}$ ) (Figura 1).

#### Figura 1

*Ubicación satelital de la FESL*



*Nota.* Adaptado de Google Earth. A) invernadero en el que se mantuvo el suelo durante los meses de evaluación; y B) parcela dónde se extrajo el suelo utilizado en la investigación.

## 4.2. Origen de las bacterias evaluadas

Las bacterias *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *Streptomyces* sp. fueron facilitadas por la empresa Laboratorio BIOMACA®. Éstas se aislaron de la rizósfera de cultivos cítricos en el distrito de Ciudad Colón, cantón de Mora, provincia de San José, Costa Rica; y se identificaron molecularmente en el CIA-UCR. Colonias de 24 h de crecimiento en placas Petri con medio de cultivo agar nutritivo se preservaron en refrigeración a ~4 °C en el laboratorio de Fitopatología-Investigación.

## 4.3. Pruebas de antagonismo *in vitro*

Con el propósito de determinar si existía alguna incompatibilidad entre las bacterias a evaluar, se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* con la técnica de Cultivos Duales, empleando la técnica de estría cruzada utilizada por Cázares-Jaramillo (2020). Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar.

Previo a la realización de las pruebas, las bacterias almacenadas a 4 °C fueron reactivadas por medio de estriado en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) sin acidificar, contenido en placas Petri (seis por bacteria), utilizando un asa bacteriológica estéril. Posteriormente, dichas placas se incubaron en la oscuridad durante 24 h, a temperatura ambiente (~25 °C).

Estas pruebas se realizaron con un diseño completamente aleatorizado (DCA), compuesto por tres tratamientos (Tabla 1), cada uno contó con cuatro repeticiones. La unidad experimental u observacional consistió en una placa Petri de vidrio de 9 cm de diámetro.

**Tabla 1**

*Tratamientos utilizados para evaluar antagonismo in vitro con prueba de estría cruzada*

<b>Tratamiento</b>	<b>Composición</b>
Pf vs Bs	<i>P. fluorescens</i> vs <i>B. subtilis</i>
Pf vs St	<i>P. fluorescens</i> vs <i>Streptomyces</i> sp.
Bs vs St	<i>B. subtilis</i> vs <i>Streptomyces</i> sp.

Para evaluar el efecto antagónico con la técnica de estría cruzada, se tomaron colonias reactivadas con un aplicador estéril (uno por bacteria y según el tratamiento), el cual se rozó de forma vertical en el centro de una placa Petri con medio PDA y se incubó en la oscuridad por 24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó la otra cepa reactivada a probar -según el tratamiento- de la misma manera, se rozó en la placa Petri horizontalmente de derecha a izquierda atravesando la cepa crecida verticalmente, y se incubaron en la oscuridad por 24 h a ~25 °C (Anexo 1).

#### **4.4. Evaluación cualitativa de la eficacia de solubilización de P *in vitro* con medio sólido**

Con cada uno de los aislamientos bacterianos se evaluó la solubilización de P *in vitro*, usando el medio de cultivo *National Botanical Research Institute Phosphate growth médium* (NBRIP) sólido, desarrollado por Nautiyal (1999). El medio contuvo 1 L de agua destilada, 15 g de agar, 10 g de glucosa, 5 g de roca fosfórica, 5 g de MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 0.2 g de KCl, 0.25 g de MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0.1 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0.025 g de azul de bromofenol. El pH se ajustó a un valor de 7.0 con NaOH (0.1 N) en un potenciómetro con electrodo de vidrio y se autoclavó a 121 °C-15 Psi por 20 min.

Para realizar la evaluación con medio NBRIP sólido, se utilizaron nuevas colonias con 24 h de crecimiento (apartado 4.3), con las cuales se realizaron diluciones seriadas en tubos de ensayo hasta una dilución de 10<sup>-5</sup>. Con una micropipeta se extrajeron 150 µl de los tubos con las diluciones 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>, se vertieron en placas Petri con medio PDA (tres placas por dilución), se esparcieron de forma homogénea sobre el medio con un asa de Drigalsky esterilizada y se incubaron en la oscuridad de forma invertida durante 24 h.

Las bacterias se ajustaron a una misma concentración (~1x10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>) con la escala 0.5 de McFarland (Wiegand, Hilpert y Hancock, 2008). El estándar se preparó disolviendo 0.1175 g de BaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O en 10 ml de agua destilada y diluyendo 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en otros 100 ml de agua; en un matraz Erlenmeyer se vertió 99.5 ml de la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se aforó con la solución de BaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O. La estandarización se hizo en un espectrofotómetro con celda de vidrio de 1 cm, el cual se calibró con un blanco (agua destilada) y con el estándar de McFarland, a una absorbancia de 625 nm.

El ajuste de concentración se realizó de la siguiente manera: un asa bacteriológica estéril (una por bacteria) se impregnó de colonias bacterianas activas de las placas Petri con la dilución 10<sup>-2</sup>, se diluyó en un vaso de precipitado (uno por bacteria) con 10,0 ml de agua destilada y se agitó hasta disolver. Posteriormente, la celda de vidrio se llenó con ~5 ml de esta solución bacteriana y se introdujo dentro del espectrofotómetro. La lectura a una absorbancia de 625 nm debió oscilar entre 0.08 y 0.13, por lo que cuando esta fue menor al rango se agregó más inóculo a la solución bacteriana contenida en los vasos de precipitado, y cuando fue mayor se agregó más agua destilada.

Estas pruebas se realizaron bajo un diseño completamente aleatorizado (DCA), compuesto por ocho tratamientos (Tabla 2), cada uno contó con cuatro repeticiones. La unidad experimental u observacional consistió en una placa Petri de vidrio de 9 cm de diámetro.

**Tabla 2**

*Tratamientos utilizados para evaluar la solubilización de P con medio NBRIP sólido*

<b>Tratamiento</b>	<b>Composición</b>
Testigo	Agua destilada
Pf	<i>P. fluorescens</i>
Bs	<i>B. subtilis</i>
St	<i>Streptomyces</i> sp.
Pf + Bs	<i>P. fluorescens</i> + <i>B. subtilis</i>
Pf + St	<i>P. fluorescens</i> + <i>Streptomyces</i> sp.
Bs + St	<i>B. subtilis</i> + <i>Streptomyces</i> sp.
Pf + Bs + St	<i>P. fluorescens</i> + <i>B. subtilis</i> + <i>Streptomyces</i> sp.

La evaluación se hizo según Mora-López, López-Restrepo, Osorio-Echeverri y Botero-Botero (2023). El medio NBRIP autoclavado se vertió en placas Petri y se dejó solidificar, mientras que discos de papel filtro estériles de 5 mm de diámetro se agregaron a los vasos de precipitado con las soluciones bacterianas ajustadas y se dejaron remojando durante 5 min. Finalmente, con una pinza metálica esterilizada se extrajo un disco remojado de cada solución bacteriana, se colocó en el centro de cada placa Petri -según el tratamiento respectivo- y se incubaron durante 7 d a ~25 °C.

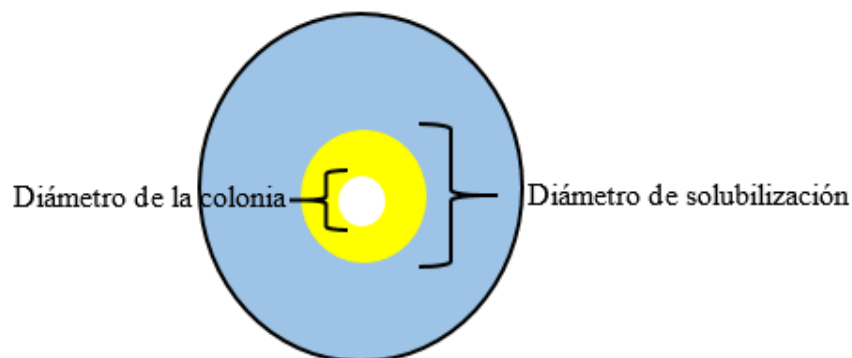
#### **4.4.1. Determinación de índices de solubilización (IS)**

Diariamente se midieron los diámetros de las colonias y de los halos originados (Figura 2). Con ambos diámetros se calcularon los índices de solubilización (IS), aplicando la siguiente fórmula utilizada por Acosta-Suárez et al. (2019):

$$\text{IS} = \frac{\text{diámetro solubilización} + \text{diámetro colonia}}{\text{diámetro colonia}}$$

## Figura 2

Medición de diámetros para determinar los índices de solubilización



### 4.4.2. Análisis estadístico

Los valores de la medición al séptimo día de evaluación fueron los utilizados en el análisis de datos. Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la variable de respuesta estudiada (índice de solubilización) se aplicaron los test Shapiro-Wilk y Bartlett, así como gráficos Q-Q vs residuales. Dado que los datos no tuvieron distribución normal ni varianzas homogéneas, se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ). Todos estos análisis se realizaron con el programa RStudio® © 2009-2023.

Asimismo, los índices de solubilización obtenidos se clasificaron con base a una escala de solubilización establecida por Matos et al. (2017), donde un valor de 1.0 representa una muy baja capacidad, entre 1.0-2.0 una baja capacidad, entre 2.0-3.0 una capacidad media y uno de más de 3.0 una alta capacidad de solubilización.

### 4.5. Cuantificación de P solubilizado, pH y producción de ácidos orgánicos *in vitro* con medio líquido

A cada uno de los aislamientos bacterianos y sus combinaciones se les cuantificó, *in vitro*, su capacidad para solubilizar P a partir de roca fosfórica, así como su producción de ácidos orgánicos. Para esto, se utilizó medio NBRIP líquido y se siguió la metodología empleada por Swain et al. (2012). Se preparó medio NBRIP sin agar (apartado 4.4) y se usaron nuevas colonias con 24 h de crecimiento (apartado 4.3), ajustadas las tres a la misma concentración de  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  (apartado 4.4).

La evaluación se hizo bajo un diseño aleatorizado, compuesto de ocho tratamientos (Tabla 3), cada uno con tres repeticiones. La unidad experimental consistió en un matraz Erlenmeyer de 125 ml.

**Tabla 3**

*Tratamientos utilizados para cuantificar el P solubilizado, pH y producción de ácidos orgánicos con medio NBRIP líquido*

<b>Tratamiento</b>	<b>Composición</b>
Testigo	Agua destilada
Pf	<i>P. fluorescens</i>
Bs	<i>B. subtilis</i>
St	<i>Streptomyces</i> sp.
Pf + Bs	<i>P. fluorescens</i> + <i>B. subtilis</i>
Pf + St	<i>P. fluorescens</i> + <i>Streptomyces</i> sp.
Bs + St	<i>B. subtilis</i> + <i>Streptomyces</i> sp.
Pf + Bs + St	<i>P. fluorescens</i> + <i>B. subtilis</i> + <i>Streptomyces</i> sp.

Se agregaron 100 ml de medio NBRIP y 1 ml de solución bacteriana ajustada a cada matraz Erlenmeyer, según el tratamiento respectivo. Estos se mantuvieron en incubación en un agitador orbital durante 5 d, a 110 rpm y una temperatura de ~25 °C.

#### **4.5.1. Cuantificación de P solubilizado y pH**

El P solubilizado se cuantificó por colorimetría, utilizando el kit test de fosfato HI 38061 con disco Checker HANNA®, el cual actúa como una adaptación del método con ácido ascórbico establecido por Murphy y Riley (1962). Diariamente, se extrajo una muestra de 6 ml de cada matraz Erlenmeyer, la cual se filtró con un papel filtro Whatman #42 y cuyo remanente se recogió en un vaso de precipitado. Con la pipeta del kit se tomaron 5 ml de muestra filtrada, se vertieron en uno de los viales y se introdujo dentro de la ranura izquierda del disco Checker; este actuó como el blanco. Asimismo, con la jeringa proporcionada en el kit se tomaron 0.75 ml de la muestra filtrada remanente en el tubo de ensayo y se vertió en el otro vial, se aforó a 7.5 ml con agua desionizada y se agitó durante 1 min. A este vial se le agregó un sobre reactivo HI 93713-0, se agitó durante 2 min, se dejó reposar por 3 min y se introdujo en la ranura derecha del disco; esta constituyó la muestra a analizar.

Con ambos viales (el blanco y la muestra) colocados en las ranuras del disco, se procedió a determinar la cantidad de P soluble. Para esto, el disco Checker® se sostuvo a una distancia de 30-40 cm del campo visual, de modo que la luz iluminara los viales desde la parte de atrás, y se fue rotando hasta hacer coincidir el color de ambas muestras. La cantidad de P soluble en mg/l se obtuvo dividiendo el valor determinado con la escala del disco entre 3.1.

Por otro lado, para determinar el pH se tomó diariamente otra muestra de 10 ml de los matraces Erlenmeyer, se filtró con papel Whatman #42 y el remanente se colectó en un vaso de precipitado. Un potenciómetro con electrodo de vidrio se introdujo en dicha solución para su lectura.

#### **4.5.2. Determinación e identificación de ácidos orgánicos**

Este análisis se hizo utilizando la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) o *Thin Layer Chromatography* (TLC, por sus siglas en inglés), modificando la metodología usada por Lee, So y Heo (2001). La presencia de ácidos orgánicos en los tratamientos se evaluó diariamente, extrayendo con una jeringa plástica otra muestra de 2 ml de los matraces Erlenmeyer en incubación, la cual se filtró con un filtro de membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  y se recolectó en un vial para HPLC de vidrio.

Para identificar los ácidos orgánicos, las muestras de cada tratamiento se compararon con los tiempos de retención ( $R_f$ ) de ácidos cítrico, fumárico, málico, tartárico y succínico de grado analítico. Cada uno de estos patrones se preparó a una concentración de 10 mg/ml, agregando 0.1 mg de ácido a un balón aforado con 10 ml de metanol; éstos se introdujeron en un baño ultrasónico hasta disolver, y con una micropipeta se tomaron 1.5 ml de cada uno que se vertieron en otro vial de HPLC.

Preparadas las muestras y los patrones, ambos viales se colocaron en las celdas de inyección de un TLC Sampler 4 automático CAMAG®, mientras que una placa para TLC de vidrio (fase estacionaria) de 10x10 cm Merck® se ubicó en la bandeja de aplicación. El equipo se configuró para aplicar un volumen en banda de 4  $\mu\text{l}$  de cada vial.

Terminadas las aplicaciones, se preparó la fase móvil dentro de una capilla de extracción de gases, agregando a un matraz Erlenmeyer acetona-agua-cloroformo-etanol-hidróxido de amonio, en una proporción de 20:2:3:14:11 (% v/v). Además, se elaboró el revelador en otro matraz Erlenmeyer, añadiendo 0.04 g de verde bromocresol, 50 ml de etanol absoluto y tres gotas de NaOH (0.1 M).

La placa se retiró del Sampler y se introdujo dentro de una cámara de desarrollo automática ADC2 CAMAG® para la aplicación de la fase móvil; esta se configuró con un tiempo de saturación de 20 min y uno de secado de 5 min. Concluido este proceso, la placa se puso dentro de un derivatizador CAMAG® equipado con boquilla azul, a la cual se le agregaron 5 ml de revelador con una micropipeta, aplicándose una aspersion de nivel 3. Seguidamente, la placa asperjada se sacó del derivatizador y se calentó con una pistola de calor a 120 °C durante 2 min. Una vez seca, la placa se puso en un visualizador 2 CAMAG®, con el que se tomaron imágenes a 254 y 366 nm.

### 4.5.3. Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre las variables de respuesta estudiadas (pH y P solubilizado), se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas en el tiempo, bajo la teoría de modelos lineales mixtos. El modelo lineal para el experimento bifactorial fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

*con: i = 1 ... 8,    j = 1 ... 5,    k = 1 ... 3*

$Y_{ijk}$ : variable de respuesta del i-ésimo, j-ésimo y la k-ésima repetición

$\mu$ : media general

$\alpha_i$ : efecto de la i-ésimo tratamiento

$\gamma_j$ : efecto de la j-ésimo tiempo de evaluación

$\delta_{ij}$ : efecto adicional (interacción) para combinación de niveles i del tratamiento y j tiempo evaluado

$\varepsilon_{ijk}$ : término de error que se distribuye normal independiente con media cero y varianza constante

De igual manera, para cada fecha de medición se aplicaron a los tratamientos pruebas de correlación de Pearson ( $p < 0.05$ ) entre las variables de pH y cantidad de P solubilizado. La realización de estas pruebas se llevó a cabo con los programas estadísticos RStudio e INFostat®.

#### **4.6. Determinación del grado de solubilización de P en el suelo**

El suelo evaluado se recolectó en la FESL, ubicada en Santa Lucía de Barva, Heredia. Este suelo pertenece al orden Andisol, y provino de una parcela destinada a la producción de maíz para ensilaje, variedad Diamantes. Este fue cultivado con dicho maíz y se mantuvo durante todo su ciclo fenológico (120 d) bajo condiciones de invernadero, en macetas plásticas (35 cm de ancho, 30 cm de alto y 18 kg de capacidad) desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0.5%, previo al llenado con suelo.

##### **4.6.1. Extracción y preparación del suelo**

Para recolectar el suelo se usó la metodología sugerida por Schweizer-Lassaga (2011) de la siguiente forma: la parcela se dividió en puntos de muestreo aleatorios a manera de zigzag y de cada uno de estos se extrajo una muestra de suelo a 30 cm de profundidad con un palín, las cuales fueron llevadas al invernadero. Luego, todo el suelo fue cribado con un tamiz de 4 mm para remover los escombros y se mezcló durante 3 d para lograr la mayor homogenización de todas las muestras.

El suelo tamizado y homogenizado se empacó en bolsas negras de polietileno y fue llevado al laboratorio de Fitopatología-Investigación para ser autoclavado por 20 min a 20 atm y 121 °C. Una vez autoclavado, el suelo se empacó en nuevas bolsas de polietileno y fue transportado al invernadero para proceder con el llenado de las macetas. De cada maceta se tomaron 4 submuestras con un barreno -esterilizado con alcohol al 95%-, se cuartearon hasta obtener una muestra final de 1 kg y fue enviada al Laboratorio de Suelos y Foliar del CIA-UCR, para determinar sus propiedades fisicoquímicas.

##### **4.6.2. Siembra de las semillas para el ensayo en condiciones de invernadero**

Se utilizaron semillas de maíz variedad Diamantes, ya que éstas son las que se siembran en la parcela de dónde proviene el suelo Andisol utilizado. Dichas semillas fueron desinfectadas por inmersión en una solución de KILOL® durante 12 h, a razón de 5 ml/L de agua. Éstas se sembraron directamente en el suelo (dos por maceta) a una profundidad de 5 cm, el día que se aplicó la tercera inoculación. El cultivo se mantuvo en monitoreo diario, con riego manual cada dos días y se fertilizó con base a los resultados del análisis fisicoquímico (Figura 3 y Figura 4).

**Figura 3**

*Análisis de propiedades químicas del suelo Andisol evaluado*

Solución Extractora:		pH	cmol(+)/L						%	mg/L				
KCl-Olsen Modificado		H2O	ACIDEZ	Al	Ca	Mg	K	CICE	SA	P	Zn	Cu	Fe	Mn
ID USUARIO	ID LAB	5,5	0,5	0,3	4	1	0,2	5		10	3	1	10	5
PARCELA EXPERIMENTAL UNA	S-20-04977	5,8	0,14	<0,14	7,98	1,33	0,58	10,03	1	16	6,2	4	82	44
-----ÚLTIMA LÍNEA-----														
Los valores debajo de cada elemento corresponden con los Niveles Críticos generales para la solución extractora usada														
CICE=Capacidad de intercambio de Cationes Efectiva=Acidez+Ca+Mg+K      SA=Porcentaje de Saturación de Acidez=(Acidez/CICE)*100														
			mS/cm	%		%		%		Relación				
			CE	Al	Fe	Ret_P	C	N	C/N					
ID USUARIO	ID LAB	1,5	Oxalato		Blakemore									
PARCELA EXPERIMENTAL UNA	S-20-04977	0,4	3,29	0,98	93,1	6,87	0,63	10,9						
-----ÚLTIMA LÍNEA-----														
OBSERVACIÓN: El % C y N totales se determinaron con el Autoanizador de C/N por combustión seca. Los valores de % C total correlacionan muy bien (R2≥0,95) con el % de MO. Si quiere estimar el valor del % MO a partir del dato de % C total determinado con esta metodología, multiplique el % C total por 1,43.														

*Nota.* Análisis realizados por el CIA-UCR

**Figura 4**

*Análisis de propiedades físicas del suelo Andisol evaluado*

		%			Clase
ID USUARIO	ID LAB	ARENA	LIMO	ARCILLA	Textural
PARCELA EXPERIMENTAL UNA	RN-20-01351	55	28	17	FRANCO ARENOSO
		Densidad aparente	Densidad Partículas	Porosidad	
ID USUARIO	ID LAB	g/cm-3		%	
PARCELA EXPERIMENTAL UNA	RN-20-01351	1,2	2,6	54	

*Nota.* Análisis realizados por el CIA-UCR

Para realizar la fertilización, los cálculos (Anexo 2) se hicieron según los requerimientos de N (100 kg/ha), P (60 kg/ha) y K (40 kg/ha) recomendados por el Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA, 2017) para maíz de la variedad Diamantes, sembrado en suelo de fertilidad media. Las fuentes fertilizantes utilizadas fueron: urea, para suplementar el nitrógeno; roca fosfórica, para suplementar el fósforo; y cloruro de potasio, para suplementar el potasio. El N se aplicó en proporciones de 25% al momento de la siembra y 75% a los 22 d después, mientras que el P y el K se aplicaron completamente al momento de la siembra. El testigo absoluto no se fertilizó con ningún elemento, el testigo químico se fertilizó con los tres nutrientes y los tratamientos inoculados se fertilizaron únicamente con N y K.

#### **4.6.3. Preparación y aplicación de los inóculos**

La concentración y dosis de bacterias a aplicar se obtuvieron empleando la técnica de dilución en placa, utilizada por Ramírez, Parra y Álvarez-Aldana (2017). Los inóculos madre refrigerados se reactivaron en matraces Erlenmeyer con 100 ml de medio papa-dextrosa (PD), colocados en un agitador orbital a 150 rpm durante 24 h. Con estas se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución  $10^{-5}$  y con una micropipeta se tomaron 150  $\mu$ l de los tubos con las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , se vertieron en una placa Petri (ocho por dilución) con medio PDA, se esparció con un asa de Drigalsky estéril y se incubaron en la oscuridad de manera invertida por 24 h a temperatura ambiente ( $\sim 25$  °C).

Para obtener las soluciones bacterianas a inocular en el suelo mediante la técnica de dilución en placa, se colocó un cuadrante sobre una de las placas Petri con la dilución  $10^{-4}$  de cada bacteria y se realizaron tres conteos de colonias (alto, medio y bajo), cuyo promedio se utilizó para aplicar un factor de dilución con el que se determinó la cantidad de placas Petri requeridas para obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  (Anexo 3), la cual se aplicó a razón de 100 ml/maceta de cada bacteria. Para esto, la cantidad de placas Petri con la dilución de  $10^{-4}$  calculadas anteriormente se humedecieron con agua destilada y las colonias se desprendieron con un asa de Drigalsky; dicha solución se vertió en un matraz Erlenmeyer y se aforó a 1600 ml con agua destilada.

Los inóculos fueron llevados al invernadero dentro de un contenedor térmico. Para realizar la aplicación, un vaso de precipitado (por bacteria) se llenó con 100 ml de la respectiva solución y se vertió directamente en el suelo, según el tratamiento respectivo. Se realizaron dos aplicaciones al mes (los días 1° y 15°) a las 15:00 h; las dos primeras aplicaciones se hicieron antes de sembrar el suelo.

Este análisis contempló nueve tratamientos (Tabla 4), cada uno con cuatro repeticiones, distribuidos en el invernadero de forma aleatorizada. La unidad experimental consistió en una maceta.

**Tabla 4**

*Tratamientos utilizados para evaluar la solubilización de P en el suelo*

<b>Tratamiento</b>	<b>Composición</b>
T.abs	Testigo absoluto (sin fertilizar, sin inocular)
T.qui	Testigo químico (fertilizado con N, P y K; sin inocular )
Pf	<i>P. fluorescens</i> (fertilizado sin P, con N y K)
Bs	<i>B. subtilis</i> (fertilizado sin P, con N y K)
St	<i>Streptomyces</i> sp. (fertilizado sin P, con N y K)
Pf + Bs	<i>P. fluorescens</i> + <i>B. subtilis</i> (fertilizado sin P, con N y K)
Pf + St	<i>P. fluorescens</i> + <i>Streptomyces</i> sp. (fertilizado sin P, con N y K)
Bs + St	<i>B. subtilis</i> + <i>Streptomyces</i> sp. (fertilizado sin P, con N y K)
Pf + Bs + St	<i>P. fluorescens</i> + <i>B. subtilis</i> + <i>Streptomyces</i> sp. (sin P, con N y K)

#### **4.6.4. Medición del contenido de P disponible y pH del suelo**

Las muestras de suelo a analizar se tomaron el día 30° de cada mes. Para determinar el pH y la concentración de P, se extrajeron de cada maceta cuatro submuestras con un barreno esterilizado con alcohol 95%, las cuales se mezclaron y se cuartearon hasta obtener una muestra de ~500 g; esta se secó al sol durante una semana y una vez seca se cribó con tamiz de 2 mm.

El pH se determinó por potenciometría en agua y KCl. Se agregaron 20 g de suelo tamizado a dos vasos de precipitado, a uno de ellos se le añadió 25 ml de agua destilada y al otro 25 ml de KCl; ambos se agitaron durante 10 min. Transcurrido este tiempo se realizó la lectura, introduciendo un peachímetro con electrodo de vidrio dentro del sobrenadante de los vasos de precipitado.

Por otro lado, la cantidad de P disponible en el suelo se evaluó por extracción con solución OLSEN-modificada (Salazar-Porras, 2015). Esta solución se preparó en un matraz Erlenmeyer con 1900 ml de agua destilada y colocado en un agitador magnético, al cual se le agregó 84 g de NaHCO<sub>3</sub> (0.5 N), 7.44 g de EDTA y 0.10 g de Súper Floc 127. El pH se ajustó a un valor de 8.5 con NaOH (1.0 M) y se aforó a 2000 ml con agua destilada.

Para analizar las muestras se tomaron 2.5 g del suelo seco y tamizado con un muestreador cilíndrico y se vertieron en un vaso de precipitado; a este se le añadió 25 ml de solución OLSEN-modificada y se colocó en un agitador orbital durante 10 min a 200 rpm. Posteriormente, el contenido se pasó por un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y el remanente se recogió en un vial, el cual se colocó dentro de un analizador por inyección de flujo (FIA), a una longitud de onda de 880 nm y una temperatura de 37 °C para su lectura de concentración.

#### 4.6.5. Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos sobre las variables de respuesta estudiadas (concentración de P disponible y pH) se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas en el tiempo, bajo la teoría de modelos lineales mixtos. El modelo lineal bifactorial fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

*con:*  $i = 1 \dots 9, \quad j = 1 \dots 5, \quad k = 1 \dots 4$

$Y_{ijk}$ : variable de respuesta del i-ésimo, j-ésimo y la k-ésima repetición

$\mu$ : media general

$\alpha_i$ : efecto de la i-ésimo tratamiento

$\gamma_j$ : efecto de la j-ésimo tiempo de evaluación

$\delta_{ij}$ : efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i del tratamiento y j tiempo de evaluación

Asimismo, para cada fecha de medición, ambas variables (concentración de P disponible y pH) se analizaron también mediante pruebas de correlación de Pearson ( $p < 0.05$ ).

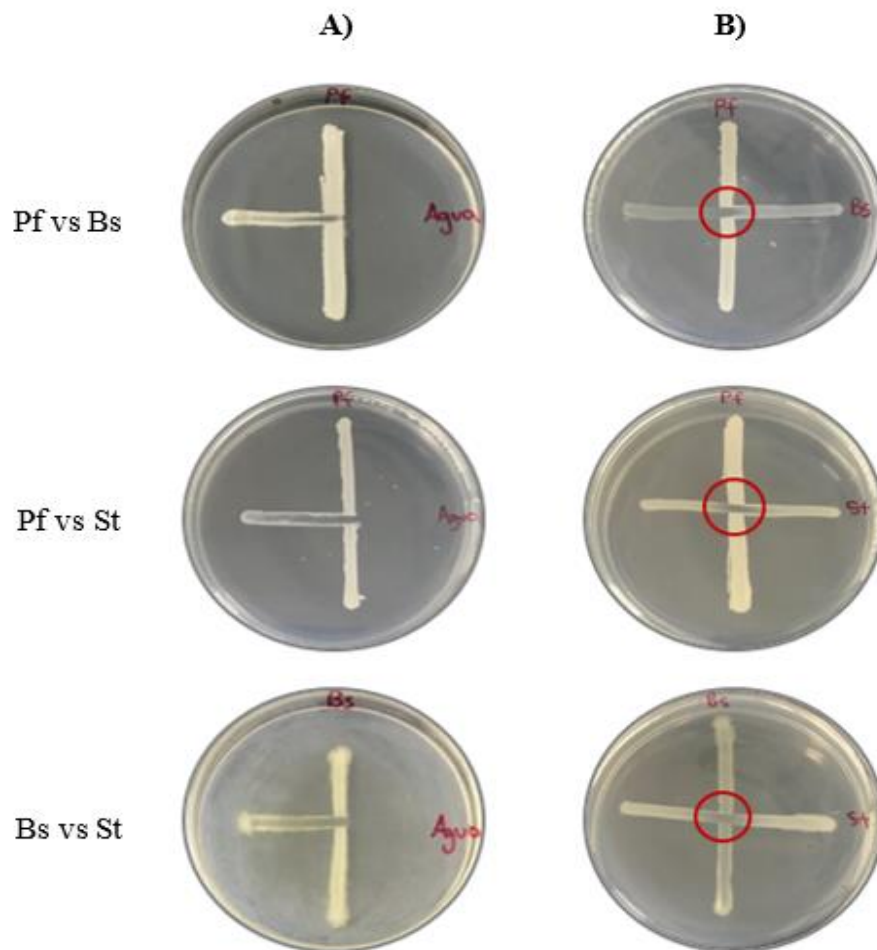
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Pruebas de antagonismo *in vitro*

Las pruebas de estría cruzada demostraron que las bacterias no tuvieron incompatibilidad entre sí en las diferentes combinaciones. Esto se evidencia en la Figura 5, en la cual se observa que no hubo antagonismo entre las bacterias, ya que no se formaron áreas de inhibición entre los cruces de crecimiento (círculos rojos); mientras que en los testigos solamente se aprecia un crecimiento bacteriano vertical.

**Figura 5**

*Pruebas de antagonismo con técnica de estría cruzada*



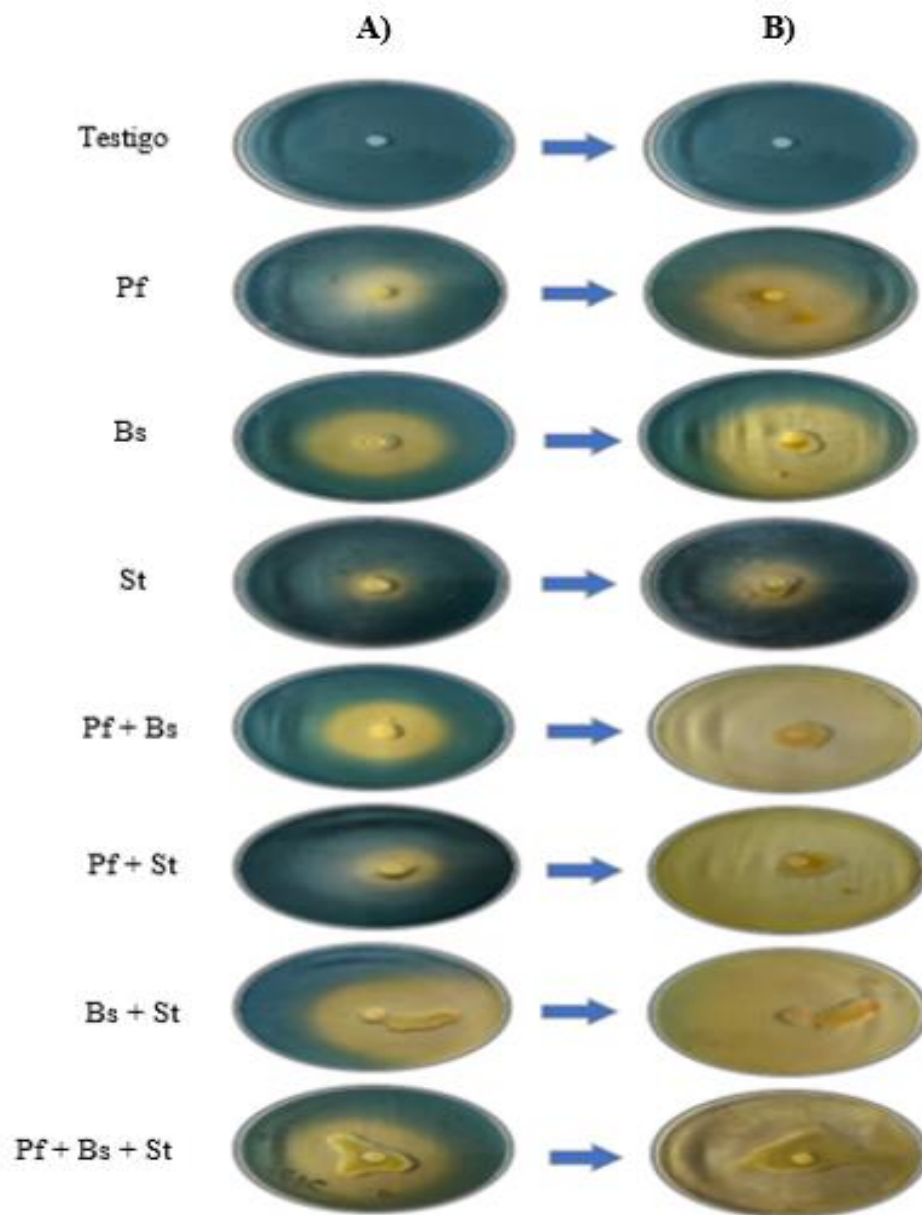
*Nota.* *B. subtilis* (Bs), *P. fluorescens* (Pf), *Streptomyces* sp.; A) tratamientos testigo y B) tratamientos inoculados.

## 5.2. Evaluación cualitativa de la eficacia de solubilización de P *in vitro* con medio sólido

Estas pruebas evidenciaron que las tres bacterias y sus co-inoculaciones solubilizaron P a partir de roca fosfórica. Dicha capacidad se presentó -excepto en el testigo- en todos los tratamientos, debido a la formación de halos traslúcidos alrededor de las colonias (Figura 6).

**Figura 6**

*Halos traslúcidos de solubilización de P formados por las bacterias al 1° y 7° día de incubación*



*Nota.* *B. subtilis* (Bs), *P. fluorescens* (Pf), *Streptomyces* sp. (St); A) halos de solubilización de P al 1° de incubación y B) halos de solubilización de P al 7° de incubación.

En la Figura 6 se ve como en todos los tratamientos -excepto en el testigo- se produjeron halos de solubilización de diferentes diámetros; este proceso comenzó a generarse a partir de las 24 h de incubación y cesó al séptimo día. Entre los tratamientos inoculados con solo una bacteria, <<Bs>> y <<St>> tuvieron el mayor y menor halo, respectivamente. Asimismo, todos los tratamientos co-inoculados presentaron halos que cubrieron completamente las placas Petri. De esta manera, al determinar los índices de solubilización (IS), se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos (Tabla 5).

**Tabla 5**

*Índices de solubilización y capacidad de los tratamientos para solubilizar P en medio NBRIP sólido*

<b>Tratamiento</b>	<b>Índice de solubilización (IS) <sup>a b</sup></b>	<b>Clasificación <sup>c</sup></b>
Testigo	0.0 f	Nula capacidad
Pf	5.85 a	Alta capacidad
Bs	4.41 d	Alta capacidad
St	2.28 e	Capacidad media
Pf + Bs	4.98 c	Alta capacidad
Pf + St	5.36 b	Alta capacidad
Bs + St	4.52 d	Alta capacidad
Pf + Bs + St	4.31 d	Alta capacidad

*Nota.* *B. subtilis* (Bs), *P. fluorescens* (Pf), *Streptomyces* sp. (St). <sup>a</sup> Valores de IS son el promedio de cuatro repeticiones. <sup>b</sup> Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), según la prueba Kruskal-Wallis. <sup>c</sup> según escala establecida por Matos et al. (2017).

De acuerdo con la Tabla 5, los tratamientos que más P solubilizaron fueron <<Pf>> y <<Pf+St>>, ya que tuvieron los índices de solubilización más altos y fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) diferentes al resto, mientras que <<St>> fue el tratamiento que presentó la menor solubilización. Por otro lado, cabe destacar que, la co-inoculación de las tres bacterias juntas <<Pf+Bs+St>> fue el segundo tratamiento con menor índice de solubilización, aunque no difirió significativamente respecto a los tratamientos <<Bs>> y <<Bs+St>>.

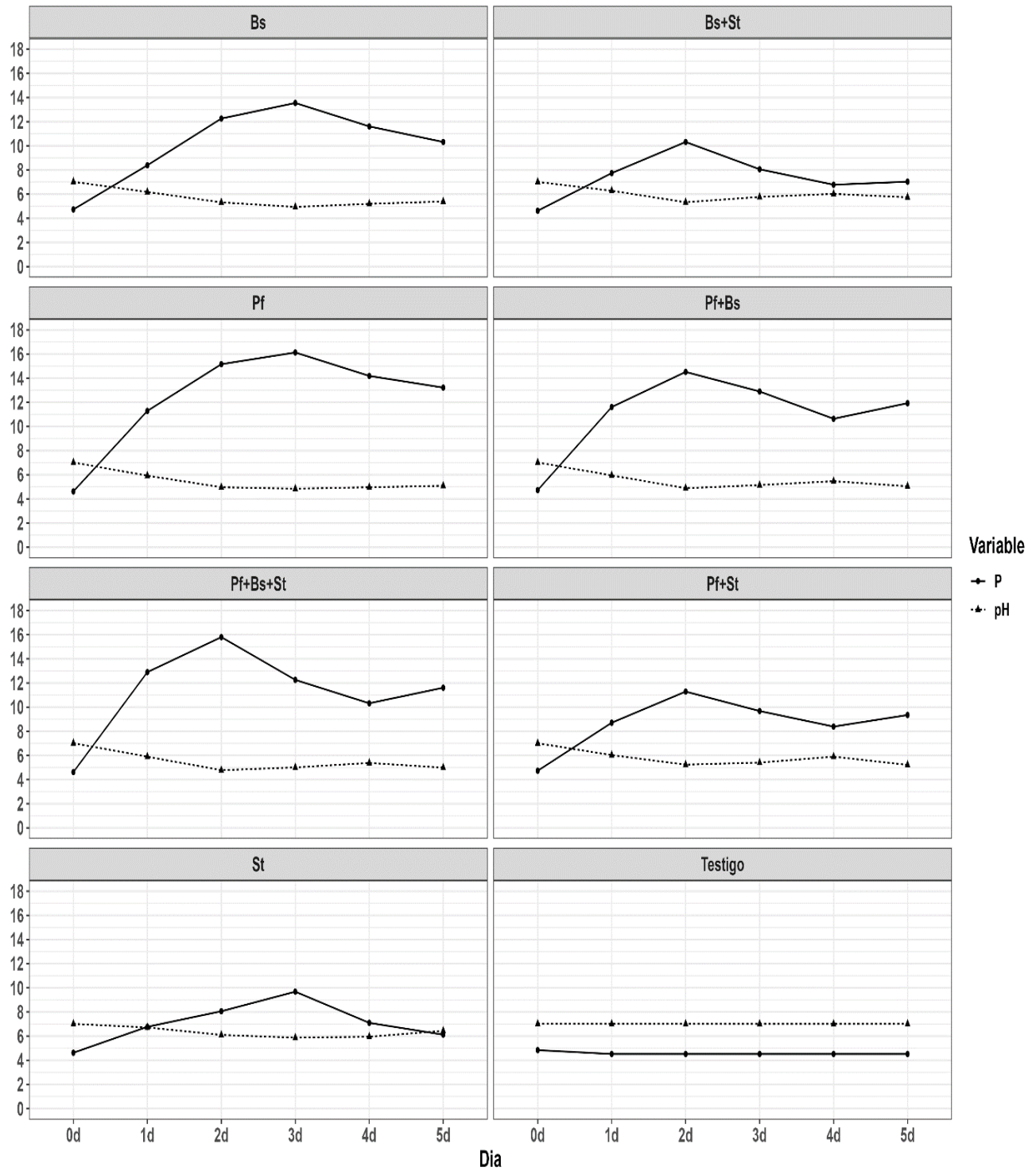
Según su capacidad de solubilización (Tabla 5), tanto las inoculaciones individuales como las co-inoculaciones presentaron una alta capacidad para solubilizar el P a partir de roca fosfórica en el medio NBRIP sólido, excepto el tratamiento <<St>>, el cual tuvo una capacidad media. Sin embargo, aunque <<St>> por sí sola tuvo la menor solubilización de todos los tratamientos, su co-inoculación con las otras dos bacterias en los tratamientos <<Bs+St>> y <<Pf+Bs+St>> resultó en una mayor capacidad de solubilización.

### **5.3. Cuantificación de P solubilizado, pH y producción de ácidos orgánicos *in vitro* con medio líquido**

Las pruebas con medio NBRIP líquido demostraron que las bacterias y sus co-inoculaciones solubilizaron P a partir de roca fosfórica, al igual que lo hicieron previamente en medio sólido (Figura 6). Además, se encontró que dicha solubilización estuvo acompañada de una disminución en el pH del medio en todos los tratamientos evaluados, a excepción del testigo (Figura 7).

**Figura 7**

*Solubilización de P (mg/l) y comportamiento del pH en medio NBRIP líquido durante cinco días de incubación*



*Nota. B. subtilis (Bs), P. fluorescens (Pf), Streptomyces sp. (St).*

Tal como se observa en la Figura 7, todos los tratamientos iniciaron (0d) con una concentración de P soluble de ~4.84 mg/l y un pH de 7.01. En el testigo, estos valores se mantuvieron relativamente constantes hasta el final del período de incubación (5d), a diferencia de los tratamientos inoculados, en los cuáles ambos parámetros variaron con el tiempo. Los tratamientos que más P solubilizaron fueron <<Pf>> (16.13 mg/l P; pH 4.85) y <<Pf+Bs+St>> (15.80 mg/l P; pH 4.74), mientras que <<St>> (9.68 mg/l P; pH 5.87) fue el que menos solubilizó; esto coincide con los resultados que se presentaron en la evaluación con medio sólido, en la que <<Pf>> y <<St>> tuvieron el mayor y el menor IS (Tabla 5), respectivamente.

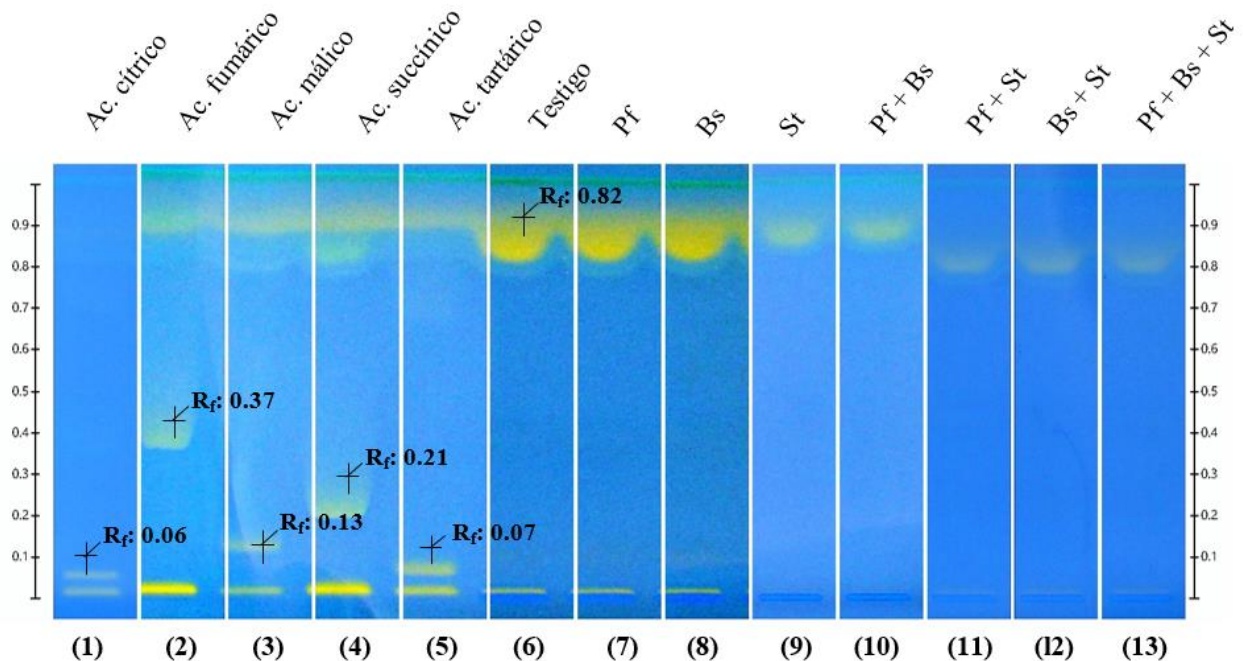
Otro aspecto por destacar de la Figura 7 es que los tratamientos -excepto el testigo- alcanzaron la mayor solubilización de P y el pH más bajo en diferentes días de incubación. En los inoculados con solo una bacteria <<Pf>> (16.13 mg/l P; pH 4.85), <<Bs>> (13.55 mg/l; pH 4.94) y <<St>> (9.68 mg/l P; pH 5.87) ocurrió en el tercer día (3d). Posteriormente, en estos tres tratamientos se presentó una disminución en la cantidad de P soluble y un aumento en el pH el cuarto (4d) <<Pf>> (14.19 mg/l P; pH 4.97), <<Bs>> (11.61 mg/l P; pH 5.20), <<St>> (7.10 mg/l; pH 5.95) y quinto día (5d) <<Pf>> (13.22 mg/l; pH 5.09), <<Bs>> (10.32 mg/l P; pH 5.39) y <<St>> (6.12 mg/l P; pH 6.09).

Por el contrario, la mayor solubilización y el pH más bajo en los tratamientos co-inoculados <<Pf+Bs>> (14.52 mg/l P; pH 4.89), <<Pf+St>> (11.29 mg/l P; pH 5.24), <<Bs+St>> (10.32 mg/l; pH 5.33) y <<Pf+Bs+St>> (15.80 mg/l P; pH 4.78) se dio en el segundo día (2d). Asimismo, en estos tratamientos también hubo una disminución en la cantidad de P y un aumento en el pH, pero en el tercer (3d) <<Pf+Bs>> (12.90 mg/l P; pH 5.15), <<Pf+St>> (9.68 mg/l; pH 5.41), <<Bs+St>> (8.06 mg/l; pH 5.77), <<Pf+Bs+St>> (12.26 mg/l P; pH 5.01) y en el cuarto día (4d) <<Pf+Bs>> (10.64 mg/l; pH 5.47), <<Pf+St>> (8.39 mg/l; pH 5.90), <<Bs+St>> (6.78 mg/l; pH 6.02), <<Pf+Bs+St>> (10.32 mg/l P; pH 5.38). Sin embargo, el quinto día (5d) se volvió a aumentar la cantidad de P soluble y descender el pH en todos ellos <<Pf+Bs>> (11.93 mg/l P; pH 5.05), <<Pf+St>> (9.35 mg/l P; pH 5.22), <<Bs+St>> (7.74 mg/l P; pH 5.74), <<Pf+Bs+St>> (11.61 mg/l P; pH 4.99).

Por otra parte, la solubilización de P que se presentó en los tratamientos pudo deberse a la disminución del pH que se dio (Figura 7), ya que las pruebas de correlación de Pearson evidenciaron que en todos los tratamientos inoculados y días de incubación se obtuvo una correlación negativa ( $p < 0.05$ ) entre ambas variables (Anexo 4). Sin embargo, a pesar de este comportamiento, no se detectaron ácidos orgánicos en el medio (Figura 8) que pudieran estar involucrados en este proceso, en ninguno de los días de incubación.

## Figura 8

Cromatograma en capa fina de ácidos orgánicos producidos por las bacterias en medio NBRIP líquido, al final del período de incubación (5d)



Nota. *B. subtilis* (Bs), *P. fluorescens* (Pf), *Streptomyces* sp. (St); tiempo de retención ( $R_f$ ).

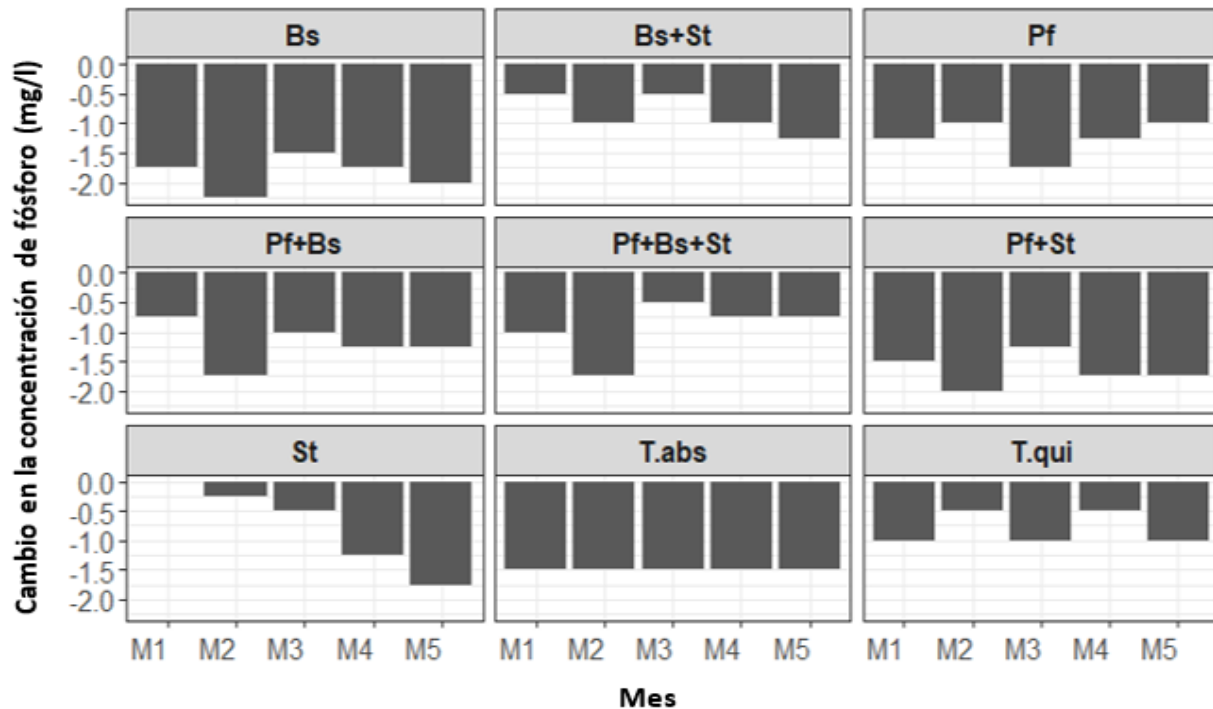
En la Figura 8 se observa que en ninguno de los tratamientos (tracks (6) a (13)) se produjeron ácido cítrico, fumárico, málico, succínico, ni tartárico en el medio, debido a que no hubo bandas que coincidieran con las de los patrones aplicados. Sin embargo, se detectó un compuesto desconocido ( $R_f$ : 0.82) que está presente en todos los tratamientos -incluido el testigo- y que no concuerda con los  $R_f$  de los patrones, por lo que posiblemente se trate de un ácido orgánico que no está dentro de los estándares utilizados, o bien, sea un metabolito que se comporte de manera similar.

### 5.4. Determinación del grado de solubilización de P en el suelo

La inoculación de las bacterias, tanto de forma individual como co-inoculadas, no aumentó la concentración de P disponible en el suelo en ninguno de los meses de evaluación. Por el contrario, se presentó una disminución en la cantidad de P en todos los tratamientos (Figura 9); de estos, solamente <<St>> en el primer mes (M1) fue significativamente ( $p > 0.05$ ) diferente a los demás (Anexo 5).

**Figura 9**

Cambio en la concentración de P disponible (mg/l) en el suelo, en función de la inoculación bacteriana, durante cinco meses (M) de evaluación



Nota. *B. subtilis* (Bs), *P. fluorescens* (Pf), *Streptomyces* sp. (St), testigo absoluto (T.abs), testigo químico (T.qui).

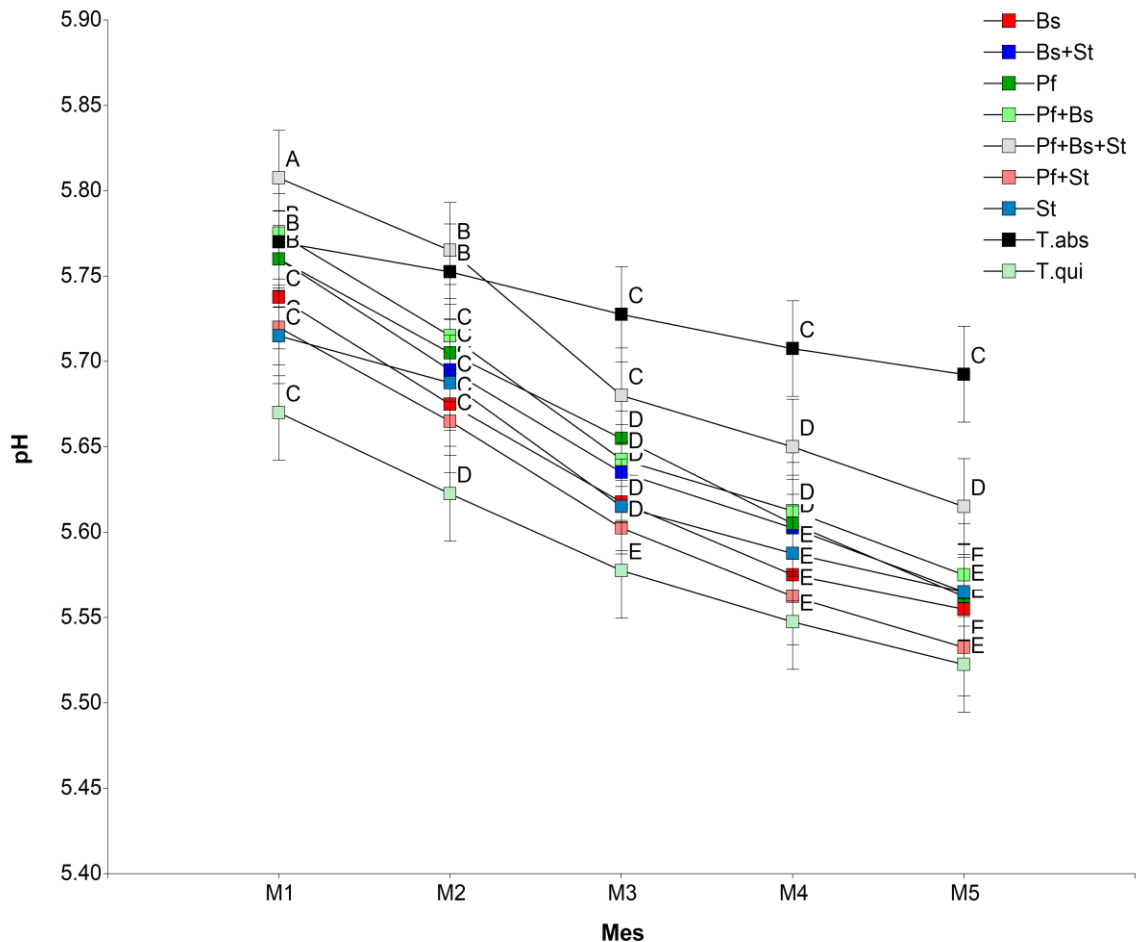
En el testigo absoluto <<T.abs>> la cantidad de P no varió, ya que en tres de las cuatro repeticiones las plantas murieron en el primer mes (M1); mientras que el testigo químico <<T.qui>> tuvo la menor disminución, posiblemente por un aporte de P de la roca fosfórica (Figura 9). Con relación a los tratamientos inoculados, <<Bs>> y <<Pf+St>> fueron los que más disminuyeron la cantidad de P (2.2 y 2.0 mg/l, respectivamente), ambos en el segundo mes (M2). Al contrario, la co-inoculación <<Bs+St>> en el primer (M1) y tercer mes (M3), <<Pf+Bs+St>> en el tercer mes (M3) y <<St>> en el segundo mes (M2) fueron los que menos disminución del P ocasionaron (0.0-0.5 mg/l).

En el primer mes (M1), la disminución en la cantidad de P pudo ocurrir por la absorción de las bacterias y varió entre tratamientos; en dicho mes, a excepción de <<St>>, los tratamientos inoculados con solo una bacteria causaron mayor disminución del P que los co-inoculados. En el segundo mes (M2), excepto <<Pf>> y <<St>>, los demás tratamientos inoculados tuvieron la mayor disminución, dado que en dicho mes fueron sembradas las plantas (Figura 9).

Por otro lado, el pH tuvo una tendencia a la disminución en todos los tratamientos durante los meses de evaluación (Figura 10), con diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre sí (Anexo 6).

**Figura 10**

*Efecto de los tratamientos en el pH del suelo durante los cinco meses (M) de evaluación*



*Nota.* *B. subtilis* (Bs), *P. fluorescens* (Pf), *Streptomyces sp.* (St), testigo absoluto (T.abs), testigo químico (T.qui). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Las barras representan la desviación estándar

Tal como se aprecia en la Figura 10, el testigo absoluto <<T.abs>> tuvo la menor disminución de pH en el tiempo, ya que pasó de 5.77 en el primer mes (M1) a 5.69 en el quinto mes (M5), siendo el más alto de todos los tratamientos al final del período de evaluación. Por el contrario, el testigo químico <<T.qui>> fue el que registró el pH más bajo de todos los tratamientos, con un valor de 5.52 en el M5.

Respecto a los tratamientos inoculados, la mayoría presentó un descenso en el pH, con diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre sí. Por ejemplo, en la Figura 10 se observa que en el primer mes (M1) la mayoría de tratamientos tuvo un pH que osciló entre 5.77 y 5.72, los cuales posteriormente alcanzaron valores entre 5.58 y 5.54 en el quinto mes (M5). De estos, el tratamiento co-inoculado con las tres bacterias <<Pf+Bs+St>> generó la disminución más pronunciada, ya que pasó de un pH de 5.81 en el primer mes (M1) a 5.62 en el quinto mes (M5). Sin embargo, a pesar de esto, junto con el testigo absoluto <<T.abs>> fueron los tratamientos con los valores de pH más altos al finalizar el tiempo de evaluación. En general, los descensos más pronunciados en el pH ocurrieron del primer (M1) al segundo mes (M2) y de este al tercer mes (M3), mientras que la menor reducción sucedió del tercer (M3) al cuarto mes (M4) y de este al quinto mes (M5).

Por otra parte, la disminución de la concentración de P disponible en el suelo pudo haber estado relacionada con el comportamiento que tuvo el pH (Figura 10), ya que con los análisis de Pearson se encontró una correlación ( $p < 0.05$ ) entre ambas variables (Anexo 7). De acuerdo con estas pruebas, tanto en el testigo absoluto <<T.abs>> como en los tratamientos inoculados hubo una correlación positiva en todos los meses de evaluación, mientras que solamente en el testigo químico <<T.qui>> se presentó una correlación negativa entre ambas variables.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Pruebas de antagonismo *in vitro*

Las bacterias *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *Streptomyces* sp. evaluadas fueron compatibles entre sí en las diferentes combinaciones (Figura 5); que éstas no presentaran una relación de antagonismo puede ser porque posiblemente, al ser cepas nativas aisladas de la misma rizósfera, han convivido durante mucho tiempo (Kumar y Gopal, 2015). El que hayan presentado este comportamiento es importante al considerar su potencial como biofertilizantes, ya que esto no solo podría reflejar su coexistencia natural *in situ*, sino que su co-inoculación podría hacer que mecanismos como la solubilización de P se vean optimizados, mediante una modificación en sus metabolismos que propicie una división del trabajo en alguna de las etapas de este proceso (Wang et al., 2018; Zhang, Merino, Okamoto y Gedalanga, 2018). Por ejemplo, este podría ser el caso de *Streptomyces* sp. <<St>>, la cual, al ser co-inoculada con *B. subtilis* y *P. fluorescens* en las pruebas de solubilización *in vitro*, su capacidad para solubilizar P mejoró (Figura 6 y Figura 7; Tabla 5).

De hecho, la co-inoculación de las bacterias no afectó su capacidad individual para solubilizar P, lo cual hace posible utilizarlas en conjunto. Por lo tanto, el que éstas sean compatibles (Figura 5) y puedan aplicarse como un consorcio microbiano para este mecanismo en particular es importante, ya que las bacterias de estas especies, por lo general, conforman parte de la microflora nativa predominante en la mayoría de suelos agrícolas, lo cual permitiría en cierta forma mejorar su eficacia, al reducir la probabilidad de relaciones de antagonismo y evitar que la solubilización de P se vea interferida (Ganesh, Kumar, Kavipriya y Krishnamoorthy, 2022; Glick, 2012; Müller et al., 2016).

### 6.2. Evaluación cualitativa de la eficacia de solubilización de P *in vitro* con medio sólido

Uno de los mecanismos de promoción del crecimiento de las PGPR es la solubilización de P. Cuando estos microorganismos solubilizan determinada fuente de P en medio sólido, bajo condiciones *in vitro*, se generan halos traslúcidos alrededor de las colonias; estos se forman debido a la liberación de ácidos orgánicos, los cuales acidifican el medio y producen un cambio de color del indicador de pH (Corrales-Ramírez et al., 2014; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018). En este estudio se evidenció que las bacterias *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *Streptomyces* sp. poseen este mecanismo, ya que formaron halos de solubilización de diferentes diámetros en las placas con medio NBRIP sólido (Figura 6) y tuvieron una alta capacidad para solubilizar P a partir de roca fosfórica (Tabla 5).

Las diferencias en el tamaño de estos halos (Figura 6) y los IS (Tabla 5) podrían atribuirse a: el tipo de ácidos orgánicos liberados y sus diferentes velocidades de difusión, la capacidad propia de cada especie, distintos grados de agotamiento de los nutrientes y acidificación debido a la excreción de  $H^+$  por asimilación del  $NH_4^+$  y la respiración celular (Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010; Patiño-Torres, 2010; Zhu, Qu, Hong y Sun, 2011).

Otros investigadores también obtuvieron una solubilización de P con roca fosfórica en medio sólido con bacterias de las especies evaluadas en este estudio. Por ejemplo, el IS de 5.85 (Tabla 5) que tuvo *P. fluorescens* es superior a los reportados por Jayadi, Baharuddin y Ibrahim (2013) y Midekssa, Löscher, Schmitz y Assefa (2015), cuyos IS fueron de 2.09 y 2.18, respectivamente. El IS de 4.4 (Tabla 5) que presentó *B. subtilis* es menor al IS de 13.47 alcanzado por Ahmad, Ahmad, Hussain y Jamil (2021), pero mayor al IS de 2.21 conseguido por Midekssa et al. (2015). Asimismo, el IS de 2.28 (Tabla 5) que mostró *Streptomyces* sp. es inferior a los de Prada-Salcedo, Prieto y Franco-Correa (2014), Boubekri et al. (2021) y Biglari, Hassan y Amini (2016), quienes obtuvieron un IS de 5.0, 3.17 y 4.93, respectivamente.

Dichas diferencias entre los IS conseguidos por otros autores y los alcanzados en este estudio se pueden atribuir a factores como: la capacidad propia de cada especie, el tiempo de evaluación, la temperatura de incubación, y el tipo de medio utilizado (NBRIP, Pikovskaya) (Alori et al., 2017; Ben Farhat et al., 2015; Chairhan et al., 2018). Este último factor incide de gran manera en los resultados obtenidos, debido a las diferentes composiciones nutricionales de cada medio, particularmente las fuentes de C-N suplementadas y el tipo de P que se evalúa como rocas fosfóricas, fosfatos de calcio, aluminio y de hierro (Azziz et al., 2012; Corrales-Ramírez et al., 2014; Hernández-Leal, Carrión y Heredia, 2011; Matos et al., 2017). Estos factores son importantes, ya que pueden inducir o reprimir la capacidad de solubilización de P de los aislamientos.

Finalmente, según Sharma et al. (2013) y Li, Zhang, Zhang, Xu y Mou (2019), evaluar la solubilización de P solo con pruebas en medio sólido, no es la forma más concluyente para determinar la capacidad real de los aislamientos, por lo que estas deben emplearse de forma preliminar y complementarse con una estimación cuantitativa. Esto se debe a que, en ocasiones, aislamientos que no formaron halos de solubilización, luego solubilizaron P en medio líquido (Corrales-Ramírez et al., 2014; Swain et al., 2012). Sin embargo, dicha situación no se presentó en este trabajo, ya que las bacterias solubilizaron P tanto en medio NBRIP sólido y líquido; incluso, el tratamiento con mayor IS <<Pf>> (Tabla 5) fue también el que más cantidad de P solubilizó en medio líquido (Figura 7).

Esto coincide con los estudios de Boubekri et al. (2021) y Muleta, Assefa, Börjesson y Granhall (2013), quienes reportaron una correlación entre los IS y la cantidad de P solubilizado en medio líquido de los mejores solubilizadores.

### **6.3. Cuantificación de P solubilizado, pH y producción de ácidos orgánicos *in vitro* con medio líquido**

Al igual que lo hicieron en medio sólido, las tres bacterias y sus combinaciones solubilizaron diferentes cantidades (mg/l) de P en medio líquido (Figura 7), lo cual coincide con los resultados de otras investigaciones. *P. fluorescens* evaluada por Vyas y Gulati (2009) solubilizó P a partir de tres tipos de roca fosfórica, con valores entre 3.8 (pH 4.00) y 236.8 µg/ml (pH 3.48); mientras que la probada por Jayadi et al. (2013) solubilizó 76.33 mg/l (pH 6.64). Con *B. subtilis*, Saeid, Prochownik y Dobrowolska-Iwanek (2018) reportaron una solubilización de 33.1, 32.0 y 41.2 mg/l con tres diferentes dosis de roca fosfórica, respectivamente; y la cepa utilizada por Hassimi et al. (2013) solubilizó ~13 mg/l (pH 4.8). En lo que respecta a *Streptomyces*, Ben Farhat et al. (2015) obtuvieron dos cepas que solubilizaron 214 (pH 4.6) y 190 mg/l (pH 5.1) de P con roca fosfórica; a su vez, Chairhan et al. (2018) reportaron cepas cuya máxima solubilización fue de 37.59 mg/ml.

Es probable que la solubilización de P que tuvieron las bacterias pudiera deberse al descenso en el pH que generaron (Figura 7), debido a la correlación negativa que hubo entre ambas variables (Anexo 4). Otros estudios realizados con roca fosfórica también tuvieron este comportamiento. Por ejemplo, Gomes, Silva, Marriel, Oliveira-Paiva y Lana (2014) obtuvieron una correlación negativa significativa ( $r = -0.89$  y  $r = -0.82$ ;  $p < 0.01$ ) con *B. subtilis* y *Streptomyces*; al igual que Shams El-Deen, Abd El-Azeem, Abd Elwahab y Mabrouk (2020), quienes reportaron una correlación negativa ( $r = -0.713$ ) entre ambas variables con *P. fluorescens* y *B. subtilis*.

A pesar de dicha correlación entre ambas variables, no se encontró la presencia de ácido cítrico, fumárico, málico, succínico ni tartárico liberados al medio (Figura 8) en ningún día de incubación. Esto concuerda con Oteino et al. (2015), quienes tampoco encontraron que *P. fluorescens* produjera ácido propiónico, cítrico, málico, succínico ni pirúvico. A su vez, difiere con el estudio de De Abreu et al. (2017) que detectaron ácido glucónico, succínico, cítrico y propiónico con *B. subtilis*; y con el de Jog et al. (2014), en el que se reportó que *Streptomyces* liberó ácido málico y glucónico. De esta manera, el no haber detectado ácidos orgánicos durante la solubilización de P por las bacterias en este trabajo, puede ser porque: se hayan producido pero en bajas concentraciones, imposibles de

detectar mediante la técnica de TLC; fueron secretados otros ácidos que no pudieron ser identificados, tal como sucedió con la cepa de *Streptomyces* evaluada por Prieto-Correal et al. (2015), la cual no secretó ácido tartárico ni succínico, pero sí otros que no estuvieron dentro de los estándares usados; o bien, éstos no se produjeron, y otros mecanismos fueron responsables de dicha solubilización (Chen et al., 2006). Por ejemplo, Aallam et al. (2021) y Ghosh, Rathinasabapathi y Ma (2015), atribuyeron la solubilización de P con roca fosfórica de *Streptomyces* y *Pseudomonas* a la producción de sideróforos; mientras que Park, Lee y Son (2009), apuntan a la excreción de H<sup>+</sup> por la asimilación bacteriana del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como un posible mecanismo responsable de la acidificación del medio.

Por otra parte, luego de haberse alcanzado la máxima solubilización, hubo una disminución en la cantidad de P y un aumento en el pH de todos los tratamientos (Figura 7); Li et al. (2019) y Azziz et al. (2012) también tuvieron este comportamiento en sus trabajos. Dicha situación podría deberse a que la concentración de P alcanza un punto en el que puede recristalizarse y volverse insoluble nuevamente, o bien, a que los ácidos orgánicos producidos y el P solubilizado sean reabsorbidos para producir nueva biomasa celular, debido al agotamiento de las fuentes nutricionales suplementadas inicialmente (Ben Farhat et al., 2015; Chairhan et al., 2018; Hernández-Leal et al., 2011). Este último factor varía entre microorganismos; por ejemplo, las células Gram positivas pueden acumularlo en su pared celular como ácido teicoico, el cual puede llegar a constituir hasta un 30% del P en células de crecimiento activo de *B. subtilis* (Beltrán-Pineda, 2014; Muleta et al., 2013; Patiño-Torres, 2010).

La cantidad de P solubilizado, la disminución del pH y la posible ausencia de ácidos orgánicos de las bacterias de este trabajo (Figura 7 y Figura 8), pudieron verse influenciados por condiciones de evaluación como: el tiempo (5d) y la temperatura de incubación (25 °C), el pH inicial del medio (7.0), el compuesto de P utilizado (roca fosfórica) y las fuentes de C-N suplementadas. Estos parámetros son importantes, ya que pueden dar un panorama previo de cómo podrían comportarse los inóculos *in situ* al ser aplicados como biofertilizantes, y en qué condiciones deberían utilizarse (Glick, 2012).

La fuente de P evaluada (roca fosfórica) probablemente tuvo que ver en resultados obtenidos, ya que la capacidad de solubilización de los aislamientos varía, debido a que hay compuestos de P más estables que otros. El fosfato tricálcico ( $2.21 \times 10^{-4}$  g/l) y el fosfato de calcio ( $2.1 \times 10^{-33}$  g/l) son más solubilizables que los fosfatos de hierro ( $1.3 \times 10^{-22}$  g/l) y de aluminio ( $1.78 \times 10^{-9}$  g/l), que a su vez son más solubilizables que las rocas fosfóricas, debido a sus composiciones mineralógicas y el tamaño variable de sus partículas (Ben Farhat et al., 2015; Gomes et al., 2014; Hernández-Leal et al., 2011; Tian, Ge, Zhang, Deng y Liu, 2021). Chairhan et al. (2018) y Fankem et al. (2008) reportan

que sus cepas de *Streptomyces* y *P. fluorescens* tuvieron mayor solubilización de P en el orden fosfato tricálcico > fosfato de aluminio > fosfato de hierro > roca fosfórica. Así, la solubilización de P a partir de roca fosfórica que tuvieron las bacterias (Figura 7), podría sugerir que éstas se puedan inocular al suelo con alguna dosis de esta fuente de P inorgánico para aumentar la disponibilidad de P. Sin embargo, sería importante determinar también su capacidad para solubilizar otros compuestos de P, en aras de determinar en qué suelo (ácido o alcalino) éstas serían más aptas para ser utilizadas como biofertilizantes para solubilizar P (Bashan, Kamnev y de-Bashan, 2013).

Las fuentes de C y N suplementadas en el medio también influyen en la solubilización de P de los microorganismos. Park et al. (2009) encontraron que la solubilización de *P. fluorescens* fue mayor con glucosa que con fructosa, independientemente de si se usó sales de amonio o de nitrato. Jog et al. (2014) encontraron que varias *Streptomyces* solubilizaron más P en el orden glucosa > fructosa > sucrosa. Kongbrailatpam y Putatunda (2018) reportaron que *B. subtilis* tuvo mayor solubilización con dextrosa y peptona que con sucrosa y nitrato de amonio. En esta investigación, las bacterias solubilizaron P con glucosa, compuesto de C comúnmente encontrado en los suelos; sin embargo, considerando que las bacterias se pueden aplicar como biofertilizantes para solubilizar P, sería importante complementar su evaluación con distintas fuentes de C y N, ya que en la rizósfera, al haber mayor diversidad de estos nutrientes, al ser aplicadas en el suelo, las bacterias que tengan la versatilidad para utilizar más de un compuesto orgánico podría tener una ventaja competitiva sobre las demás (Patiño-Torres, 2010).

El pH inicial del medio (que en este estudio fue 7.0) pudo haber favorecido la solubilización de P, ya que es el óptimo para la fisiología de las bacterias evaluadas (Álvarez-García et al., 2020; Villareal-Delgado et al., 2017). Esto concuerda con los estudios de Chairhan et al. (2018) y Maheswar y Sathiyavani (2012), en los que *Streptomyces* y *B. subtilis* también tuvieron la mayor solubilización con un pH de 7.0. El efecto de esta variable sobre la solubilización de las bacterias queda en evidencia, ya que en el suelo las bacterias no fueron capaces de solubilizar P como lo hicieron en estas pruebas *in vitro*, posiblemente porque el pH ácido (5.8) del suelo afectó su fisiología. Entonces, con base a este comportamiento, la inoculación de *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *Streptomyces* sp. como biofertilizantes para aumentar la disponibilidad de P podría ser apropiada para suelos alcalinos, o bien, para aplicar al momento del encalado en suelos ácidos.

El período de evaluación también se relaciona con la solubilización de P, ya que cada especie la logra en tiempos diferentes (Fankem et al., 2008; Li et al., 2019). En este trabajo las bacterias

evaluadas alcanzaron la mayor solubilización el segundo y tercer día (Figura 7). Por el contrario, *P. fluorescens* y *Streptomyces* evaluadas por Park et al. (2009) y Prieto-Correal et al. (2015) lo hicieron el sexto y cuarto día, respectivamente. En el caso de <<St>>, bacteria que tuvo la menor solubilización (Figura 7), quizás ésta necesite de un tiempo de incubación mayor a siete días, ya que Chairhan et al. (2018) y Biglari et al. (2016) reportaron que algunas cepas de *Streptomyces* tuvieron la mayor solubilización de P hasta los quince y catorce días. De cualquier manera, el que las bacterias hayan solubilizado P *in vitro* en poco tiempo es importante, ya que existe la posibilidad de que al ser aplicadas continuamente en el suelo, éstas propicien una rápida disponibilidad de P.

La temperatura de incubación pudo haber influido en la solubilización de P de las bacterias ya que investigaciones han encontrado que, incluso una misma cepa, ha presentado distintos niveles de solubilización cuando se evalúa a diferentes temperaturas. Por ejemplo, en sus estudios realizados con roca fosfórica, Chairhan et al. (2018) reportaron que una cepa de *Streptomyces* alcanzó la máxima solubilización de P a 37 °C, mientras que *B. subtilis* aislada por Maheswar y Sathiyavani (2012) la consiguió a 40 °C, valores mayores al de este estudio (~25 °C). Este comportamiento podría sugerir que el uso de estas bacterias para solubilizar P debiera darse principalmente en suelos con climas de esta temperatura. Asimismo, sería importante evaluar entonces su capacidad de solubilización de P a diferentes temperaturas, esto para determinar en qué otros climas serían aptos la aplicación de estas bacterias como biofertilizantes para aumentar la disponibilidad de P.

#### **6.4. Determinación del grado de solubilización de P en el suelo**

La deficiencia de P del suelo Andisol evaluado solo se corrigió con el tratamiento químico <<T.qui>> fertilizado con roca fosfórica y no con ninguno de los tratamientos inoculados, ya que las bacterias no aumentaron la cantidad de P disponible (Figura 9); esto se evidenció, ya que las plantas con suelo inoculado tuvieron hojas púrpuras, síntoma característico de deficiencia de P (Fernández, 2007). Estos resultados difieren con los obtenidos por Patiño-Torres (2010) en condiciones de invernadero, ya que la inoculación del suelo con *Pseudomonas* y *Bacillus* cubrió el déficit de P y las plantas de maíz no manifestaron este síntoma; así como con los reportados por Omar et al. (2022), cuya inoculación con *Streptomyces* aumentó la concentración de P en el suelo. Sin embargo, a diferencia de este trabajo, en ambos estudios la inoculación se hizo con dosis de roca fosfórica. Por lo tanto, considerando que las bacterias en este estudio tuvieron una alta capacidad para solubilizar P a partir de roca fosfórica *in vitro* (Tabla 5; Figura 7), y que el testigo químico

<<T.qui>> con esta fuente de P fue el único que corrigió la deficiencia en el suelo, es probable que éstas deban aplicarse junto con alguna dosis de este fertilizante para favorecer su solubilización en suelos Andisoles, y así, aumentar la disponibilidad de este elemento para su absorción por la planta.

Aunque *in vitro* se demostró que *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *Streptomyces* sp. poseen la capacidad de solubilizar P inorgánico (Tabla 5; Figura 7), este mecanismo no se expresó en el suelo, ya que éstas no aumentaron la concentración de P disponible (Figura 9). Esto coincide con los resultados obtenidos por Ng et al. (2022) y Collavino, Sansberro, Mroginski y Aguilar (2010) en condiciones de invernadero, en los que la inoculación de suelos ácidos con *B. subtilis* y *P. fluorescens* no aumentó la cantidad de P, a pesar de que *in vitro* tuvieron esa capacidad. Este comportamiento puede ser porque según Park et al. (2009) y Cano (2011), resultados positivos *in vitro* no siempre conlleva a obtener resultados iguales en campo o invernadero, ya que los mecanismos que demuestran ser eficaces en laboratorio, no necesariamente se comportarán de manera similar en el suelo.

En línea con lo anterior, los inóculos o biofertilizantes microbianos desarrollados a partir de un suelo en particular, no necesariamente ejercerán sus mecanismos de promoción de la misma manera al ser aplicados en otros suelos que tienen propiedades fisicoquímicas diferentes, ya que pueden no alcanzar densidades óptimas ni superar exitosamente la microflora nativa ya establecida, por lo que no pueden colonizar ni sobrevivir en la rizósfera (Jog et al., 2014; Mendes et al., 2013; Moreno-Reséndez et al., 2018). Es por esta razón que Compant et al. (2019) y Shah, Shah y Shah (2021) sugieren que los inóculos se utilicen en el suelo dónde fueron aislados, debido a que tendrían una mayor resiliencia y aclimatación fisiológica a sus condiciones ambientales, lo que aumentará la probabilidad de que éstas ejerzan eficazmente los mecanismos deseados. De esta manera, a pesar de que las bacterias de este trabajo posiblemente habrán convivido durante mucho tiempo, al provenir de otra rizósfera, es posible que su inoculación como biofertilizantes requiera de un período de adaptación al ser aplicadas en suelos con diferentes condiciones ambientales (Saez, Aparicio, Amoroso y Benimeli, 2015).

Uno de los principales factores por los cuales pudo haberse dado la disminución en la concentración de P disponible (Figura 9) es por la falta de materia orgánica (que no fue añadida), ya que las bacterias requieren compuestos orgánicos lábiles que aporten suficientes nutrientes para su metabolismo (Mendes et al., 2013; Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010; Patiño-Torres, 2010). Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro (2018) destacan que una relación C:N:P de 100/10/1 o cercana favorece la mineralización/solubilización del P, ya que los microorganismos no necesitan

incorporar e inmovilizar el P de la solución a su biomasa, sino que lo transforman en ortofosfatos. De esta manera, al no haber agregado materia orgánica, es probable que las bacterias tuvieran que competir con las plantas, no solo por el poco P disponible, sino que también por las fuentes de C y N, lo cual pudo generar un déficit energético en sus metabolismos que quizás limitó su producción de enzimas y ácidos orgánicos, presentándose una inmovilización del P (Hasan et al., 2016; Mendes et al., 2013; Sharma et al., 2013; Tapia-Torres y García-Oliva, 2016). Por lo tanto, se debe considerar al aplicar éstas bacterias como biofertilizantes, realizarlo junto con alguna fuente de materia orgánica para estimular su solubilización de P.

El pH también pudo haber afectado la solubilización de P por parte de las bacterias en el suelo, ya que fue más bajo que el valor óptimo (7.0) requerido para su metabolismo. Un pH ácido como el que hubo (Figura 10) pudo haber originado un mayor contenido de  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Al}^{+3}$  solubles, lo que quizás causó la muerte de las colonias, o bien, que éstas adoptaran sus estadios de latencia (endosporas, biopelículas), además de que el P se retuviera más fuertemente, debido a la correlación positiva entre la disminución del pH y la concentración de P disponible (Anexo 7) (Fernández, 2007; Miransari, 2013; Msimbira y Smith, 2020; Ojo, Olajire-Ajayi, Dada y Wahab, 2015). Esto concuerda con estudios en los que se menciona que en suelos ácidos las bacterias no exhiben una gran solubilización, a diferencia de los hongos, los cuales prefieren pH ácidos para su crecimiento y secretan más ácidos orgánicos (Alori et al., 2017; Garcidueñas-Piña y Cervantes, 1996; Patiño-Torres, 2010; Rodríguez-Gacha y Sánchez-Castro, 2018). Por lo tanto, el potencial como biofertilizantes de las bacterias de este trabajo podría ser más apto para suelos alcalinos, ya que su fisiología podría no verse afectada y los fosfatos de calcio son más solubilizables; incluso, su aplicación en conjunto con algún hongo benéfico compatible podría favorecer su solubilización de P en suelos ácidos como este, ya que algunos exudados fúngicos estimulan la colonización de las actinobacterias y proteobacterias (Cano, 2011; Ben Farhat et al., 2015; Gomes et al., 2014; Hernández-Leal et al., 2011; Müller et al., 2016; Oliveira et al., 2009).

Por otro lado, aunque en este trabajo la evaluación se centró en determinar la solubilización de P en el suelo, la presencia de plantas de maíz pudo tener alguna incidencia en la dinámica de solubilización de P de las bacterias por dos razones: al no haber incorporado materia orgánica, su rizodepósito constituye la principal fuente de nutrientes para su colonización y sobrevivencia; además, sus raíces tienen una repercusión en el comportamiento del pH y la difusión del P en la rizósfera (Ahmad et al., 2019; Bakker et al., 2020; Cano, 2011; Fernández, 2007; Msimbira y Smith, 2020). Por lo tanto, aunado al hecho de que no se incorporó materia orgánica al suelo, el que las

plantas no se desarrollaran adecuadamente tal vez no solo hizo que su rizodepósito no fuera suficiente para mantener viables las bacterias, sino que más bien pudo haber causado una competencia por nutrientes que se tradujo en la disminución de la cantidad de P disponible en el suelo (Figura 9).

Entonces, el que las bacterias de esta investigación no solubilizaran el P del suelo Andisol, no quiere decir que éstas no sean potenciales biofertilizantes, sino que quizás solo no fueron aptas para este suelo en particular y en las condiciones evaluadas (Ganesh et al., 2022). A esta conclusión también llegaron Vargas Barrantes y Castro Barquero (2018), quienes al aislar microorganismos solubilizadores en suelos Andisoles de Costa Rica, determinaron que el que éstos no fueran capaces de aumentar la cantidad de P, podría deberse a las características propias de estos suelos en estudio. Esto puede ser porque los Andisoles, al tener una gran capacidad de retención de P respecto a otros órdenes, es posible que las arcillas y los sitios de sorción retuvieron las formas lábiles con una fuerza que hizo difícil de solubilizar para las bacterias mediante ácidos orgánicos o enzimas (Do Carmo Horta y Torrent, 2007; Osorio y Habte, 2013).

Por lo tanto, aunque en el suelo Andisol evaluado las bacterias no aumentaron la concentración de P disponible, existe la posibilidad de que al ser aplicadas como biofertilizantes en otros suelos este no sea el caso, ya que tal vez éstas poseen otros mecanismos que podrían ser específicos para otros suelos y no para este en particular (Glick, 2012). Es decir, aunque se encontró que las bacterias de esta investigación tienen la capacidad de solubilizar P inorgánico, probablemente para éstas resulta más eficaz aumentar la cantidad de P mediante mineralización enzimática, por lo que al no incorporar materia orgánica, este quizás no se expresó en el suelo de este estudio. Asimismo, cabe la posibilidad de que las bacterias también tengan la capacidad de producir fitohormonas como el ácido-3-indolacético, la cual, estudios han encontrado que puede aumentar la disponibilidad de P para la planta de manera indirecta, aumentando el volumen radicular y mejorando la absorción, y no necesariamente incidiendo de forma directa sobre el P fijado en el suelo (Boubekri et al., 2021; Jog et al., 2014; Ng et al., 2022; Omar et al., 2022).

## 7. CONCLUSIONES

- A través de los ensayos con medio NBRIP sólido y líquido, realizados en condiciones *in vitro*, se pudo comprobar que *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *Streptomyces* sp. tienen la capacidad para solubilizar P inorgánico. Aunque dicho proceso estuvo acompañado de un descenso en el pH, no se logró detectar la presencia de ácido cítrico, málico, fumárico, succínico ni tartárico en el medio. De esta manera, es posible que se hayan producido otros ácidos orgánicos que no estuvieron dentro de los evaluados en este estudio, o bien, que dicha solubilización pudiera deberse a otros mecanismos, y no exclusivamente a la producción de ácidos orgánicos.
- La solubilización de P que tuvieron las bacterias *in vitro*, no se correspondió con un aumento en la concentración de P disponible en el suelo Andisol bajo condiciones de invernadero. Este comportamiento no significa que éstas no puedan ser potenciales biofertilizantes para solubilizar P, sino que tal vez no son aptas para este suelo evaluado en particular, debido a sus características edafológicas propias y otras variables ambientales. Por ejemplo, el pH ácido del suelo probablemente afectó el establecimiento y sobrevivencia de las bacterias en la rizósfera, mientras que el bajo contenido de materia orgánica pudo haber ocasionado que las bacterias tuvieran que competir con las plantas por nutrientes, lo que quizás limitó su producción de ácidos orgánicos y causó una inmovilización del P disponible.
- El pH pudo tener un papel fundamental en la solubilización de P de las bacterias, tanto en condiciones *in vitro* como en el suelo, debido a la correlación negativa y positiva que hubo entre las variables en ambos ambientes, respectivamente. Esto queda en evidencia, ya que en el suelo (pH 5.8) las bacterias no solubilizaron P como lo hicieron en las pruebas de laboratorio (pH 7.0), tal vez porque el pH ácido afectó su fisiología y retuvo el P disponible con una fuerza difícil de solubilizar para las bacterias mediante ácidos orgánicos u otros mecanismos. Por lo tanto, considerando que *in vitro* las tres bacterias fueron capaces de solubilizar P a partir de roca fosfórica, y que en condiciones de invernadero el testigo químico con esta fuente fertilizante fue el único tratamiento que corrigió la deficiencia de P en el suelo, es probable que deban aplicarse con alguna dosis de roca fosfórica para estimular su solubilización, o bien, éstas sean más aptas para ser utilizadas como biofertilizantes en suelos alcalinos.

## 8. RECOMENDACIONES

- Evaluar, *in vitro*, la solubilización de P de las bacterias con fosfatos de hierro y de aluminio, así como su capacidad para producir enzimas fosfatasas y fitohormonas como el ácido-3-indolacético.
- Determinar la solubilización de P de las bacterias en el suelo, incorporando alguna fuente de materia orgánica o junto con diferentes dosis de roca fosfórica.
- Analizar la actividad solubilizadora de P de las bacterias utilizando otras plantas indicadoras en condiciones de campo, y complementarla con un análisis de concentración de P en el tejido vegetal.
- Probar la capacidad de las bacterias para solubilizar P en otros suelos (alcalinos) y en diferentes climas.

## 9. REFERENCIAS

- Aallam, Y., Dhiba, D., Lemriss, S., Souiri, A., Karray, F., Rasafi, T. E., Saïdi, N., Haddioui, A., El Kabbaj, S., Virolle, M. J. y Hamdali, H. (2021). Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing *Streptomyces* sp. Endemic from Sugar Beet Fields of the Beni-Mellal Region in Morocco. *Microorganisms*, 9(5), 914. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050914>
- Acosta-Suárez, M., Cruz-Martín, M., Pichardo, T., Rodríguez, E., Barbón, R., Capote, A., Pérez, A. y Alvarado-Capó, Y. (2019). Solubilización de fosfatos *in vitro* por cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* y promoción del crecimiento de plantas de café. *Biotecnología Vegetal*, 19(1), 65-72. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2074-86472019000100065&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-86472019000100065&lng=es&tlng=es)
- Ahmad, M., Adil, Z., Hussain, A., Mumtaz, M., Nafees, M., Ahmad, I. y Jamil, M. (2019). Potential of phosphate solubilizing *Bacillus* strains for improving growth and nutrient uptake in mung bean and maize crops. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 56(2), 283-289. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/19.7285>
- Ahmad, I., Ahmad, M., Hussain, A. y Jamil, M. (2021). Integrated use of phosphate-solubilizing *Bacillus subtilis* strain IA6 and zinc-solubilizing *Bacillus* sp. strain IA16: a promising approach for improving cotton growth. *Folia Microbiologica*, 66(1), 115-125. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00831-3>
- Alori, E. T., Glick, B. R. y Babalola, O. O. (2017). Microbial Phosphorus Solubilization and its potential for use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8(971), 1-5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Alvarado, A. (2001). Manejo de suelos derivados de cenizas volcánicas. En G. Meléndez y E. Molina (eds.). Fertilidad de suelos y manejo de la nutrición de cultivos en Costa Rica, 2001, Laboratorio de Suelos y Foliare, CIA/UCR, San José, Costa Rica. 11-26. <http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/Memorias/Memoria%20Curso%20Fertilidad%20de%20Suelos.pdf>
- Álvarez-García, J. A., Santoyo, G. y Rocha-Granados, M. (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 16(1), 1-10. <http://dx.doi.org/10.33154/rlrn.2020.01.01>

- Anderson, A. S. y Wellington, E. M. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 797-814. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-797>
- Andreani, N. A., Martino, M. E., Fasolato, L., Carraro, L., Montemurro, F., Mioni, R., Bordin, P. y Cardazzo, B. (2014). Tracking the blue: A MLST approach to characterize the *Pseudomonas fluorescens* group. *Food Microbiology*, 39, 116-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.012>
- Aristizábal-Gutiérrez, F. A. y Cerón-Rincón, L. E. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285-295. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
- Azziz, G., Bajsa, N., Haghjou, T., Taulé, C., Valverde, A., Igual, J. y Arias, A. (2012). Abundance, diversity and prospecting of culture able phosphate solubilizing bacteria on soils under crop pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. *Applied Soil Ecology*, 61, 320-326. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.004>
- Bakker, P., Berendsen, R. L., Van Pelt, J. A., Vismans, G., Yu, K., Li, E., Van Bentum, S., Poppeliers, S., Sánchez-Gil, J. J., Zhang, H., Goossens, P., Stringlis, I., Song, Y., De Jonge, R. y Pieterse, C. (2020). The Soil-Borne Identity and Microbiome-Assisted Agriculture: Looking Back to the Future. *Molecular Plant*, 13(10), 1394-1401. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.09.017>
- Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C. y Standing, D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science*, 4(6), 378-383. [http://www.cropj.com/banerjee\\_4\\_6\\_201...](http://www.cropj.com/banerjee_4_6_201...)
- Bashan, Y., Kamnev, A. A. y de-Bashan, L. E. (2013). A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 49, 1-2. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0756-4>
- Baum, M. M., Kainović, A., O'Keefe, T., Pandita, R., McDonald, K., Wu, S. y Webster, P. (2009). Characterization of structures in biofilms formed by a *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 9(103). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-103>
- Beltrán-Pineda, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol15\\_num1\\_art:401](https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num1_art:401)

- Ben Farhat, M., Boukhris, I. y Chouayekh, H. (2015). Mineral phosphate solubilization by *Streptomyces* sp. CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids. *FEMS Microbiology Letters*, 362(5), 1-7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv008>
- Biglari, N., Hassan, H. M. y Amini, J. (2016). The Ability of *Streptomyces* spp. isolated from Iranian soil to solubilize rock phosphate. *Advances in Bioscience and Clinical Medicine*, 4(3), 15-25. <https://doi.org/10.7575/aiac.abcmcd.16.04.03.03>
- Boubekri, K., Soumare, A., Mardad, I., Lyamlouli, K., Hafidi, M., Ouhdouch, Y. y Kouisni, L. (2021). The Screening of Potassium and Phosphate-Solubilizing Actinobacteria and the Assessment of Their Ability to Promote Wheat Growth Parameters. *Microorganisms*, 9(470), 1-16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030470>
- Briceño, G., Fuentes, M. S., Sáez, J. M., Díez, M. C. y Benimeli, C. S. (2018). *Streptomyces* genus as biotechnological tool for pesticide degradation in polluted systems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 48(10-12), 773-805. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1476958>
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp., una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 14(2), 15-31. <https://doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.771>
- Cázares-Jaramillo, G. E. (2020). *Evaluación antagonista in vitro de bacterias aisladas de ecosistemas marinos en contra de Vibrio parahaemolyticus AHPND como patógeno de importancia acuícola*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Repositorio Académico Digital. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/19722>
- Chaiharn, M., Pathom-aree, W., Sujada, N. y Lumyong, S. (2018). Characterization of Phosphate Solubilizing *Streptomyces* as a Biofertilizer. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(2), 701-716. [https://www.researchgate.net/publication/324795422\\_Characterization\\_of\\_phosphate\\_solubilizing\\_Streptomyces\\_as\\_a\\_biofertilizer](https://www.researchgate.net/publication/324795422_Characterization_of_phosphate_solubilizing_Streptomyces_as_a_biofertilizer)
- Chater, K. F. (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 361(1469), 761-768. <http://doi.org/10.1098/rstb.2005.1758>

- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A. y Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 33-41. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>
- Cisneros-Rojas, C. A., Sánchez de Prager, M. y Menjivar-Flores, J. C. (2017). Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 149-158. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.22021>
- Collavino, M. M., Sansberro, P. A., Mroginski, L. A. y Aguilar, O. M. (2010). Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils*, 46, 727-738. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0480-x>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H. y Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Corrales-Ramírez, L. C., Arévalo-Gálvez, Z. Y. y Moreno-Burbano, V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 12(21), 68-77. <https://doi.org/10.22490/24629448.997>
- De Abreu, C. S., Figueiredo, J. E., Oliveira, C. A., Dos Santos, V. L., Gomes, E. A., Ribeiro, V. P., Barros, B. A., Lana, U. G. y Marriel, I. E. (2017). Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genetics and Molecular Research*, 16(1), 2-12. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16019294>
- De Lima Procópio, R. E., Da Silva, I. R., Martins, M. K., De Azevedo, J. L. y De Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466-471. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- De Souza, R., Ambrosini, A. y Passaglia, L. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401-419. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Do Carmo Horta, M. y Torrent, J. (2007). Phosphorus desorption kinetics in relation to phosphorus forms and sorption properties of Portuguese acid soils. *Soil Science*, 172(8), 631-638. <http://dx.doi.org/10.1097/ss.0b013e3180577270>

- Duff, S., Sarath, G. y Plaxton, W. (1994). The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum*, 90(4), 791-800. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb02539.x>
- Echeverri-Echeverri, J. (2018). *Dinámica del fósforo en suelo-planta en regiones tropicales*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional UNAL. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/69611>
- Errington, J. y Van der Aart, L. T. (2020). Microbe profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development and industrial workhorse. *Microbiology*, 166(5), 425-427. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000922>
- Fankem, H., Ngo Nkot, L., Deubel, A., Quinn, J., Merbach, W., Etoa, F. y Nwaga, D. (2008). Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon. *African Journal of Microbiology Research*, 2, 171-178. <http://www.academicjournals.org/ajmr>
- Fernández, M. T. y Rodríguez, H. (2005). El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos. *ICIDCA sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 39(3), 27-34. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120688005>
- Fernández, M. T. (2007). Fósforo: amigo o enemigo. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(2), 51-57, <http://repositoriodigital.academica.mx/jspui/handle/987654321/382488>
- Ganesh, R. S. V., Kumar, M. N., Kavipriya, J. y Krishnamoorthy, R. (2022). Constrains in Biofertilizer Development and Environmental Factors Influencing its Survival in Soil: A Review. *Agricultural Reviews*, 44(2), 1-6. <https://doi.org/10.18805/ag.R-2348>
- Garcidueñas-Piña, R. y Cervantes, C. (1996). Microbial interactions with aluminum. *BioMetals*, 9, 311-316. <https://doi.org/10.1007/BF00817932>
- Garrido-Sanz, D., Arrebola, E., Martínez-Granero, F., García-Méndez, S., Muriel, C., Blanco-Romero, E., Martín, M., Rivilla, R. y Redondo-Nieto, M. (2017). Classification of isolates from the *Pseudomonas fluorescens* complex into phylogenomic groups based in group-specific markers. *Frontiers in Microbiology*, 8(413), 1-9. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00413>

- Ghosh, P., Rathinasabapathi, B. y Ma, L. Q. (2015). Phosphorus solubilization and plant growth enhancement by arsenic-resistant bacteria. *Chemosphere*, 134, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.048>
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012(963401), 1-15. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>
- Gomes, E. A., Silva, U de C., Marriel, I. E., Oliveira-Paiva, C. A. y Lana, U. G de P. (2014). Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 13(1), 69-81. <http://dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v13n1p69-81>
- Gopalakrishnan, S., Srinivas, V. y Prasanna, S. L. (2020). *Streptomyces*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 55-71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00005-8>
- Gutiérrez-Calvo, A. E. (2019). *Evaluación del efecto de Bacillus subtilis en la promoción del crecimiento en maíz (Zea mays L.)*. [Tesis de maestría, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas]. Repositorio UNICACH. <https://hdl.handle.net/20.500.12753/448>
- Härtig, E. y Jahn, D. (2012). Regulation of the anaerobic metabolism in *Bacillus subtilis*. *Advances in Microbial Physiology*, 61(5), 195-216. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00005-6>
- Harwood, C. R., Pohl, S., Smith, W. y Wipat, A. (2013). *Bacillus subtilis*: Model Gram-positive synthetic biology chassis. *Methods in Microbiology*, 40(4), 87-90. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417029-2.00004-2>
- Hasan, M., Hasan, M., Teixeira Da Silva, J. A. y Li, X. (2016). Regulation of phosphorus uptake and utilization: transitioning from current knowledge to practical strategies. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 21(7), 2-19. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0008-y>
- Hasani, A., Kariminik, A. y Issazadeh, K. (2014). Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(1), 63-75. <http://www.ijabbr.com/>
- Hassimi, M. S., Hamdali, H., Ouhdouch, Y., Pinelli, E., Merlina, G., Claude, R. J. y Hafidi, M. (2013). Moroccan rock phosphate solubilization during a thermo-anaerobic grassland waste biodegradation process. *African Journal of Biotechnology*, 12(49), 6859-6865. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12804>

- Hernández-Leal, T. I., Carrión, G. y Heredia, G. (2011). Solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, 45(8), 881-892. [https://www.researchgate.net/publication/262735787\\_Solubilizacion\\_in\\_vitro\\_de\\_fosfatos\\_por\\_una\\_cepa\\_de\\_Paecilomyces\\_lilacinus\\_Thom\\_Samson](https://www.researchgate.net/publication/262735787_Solubilizacion_in_vitro_de_fosfatos_por_una_cepa_de_Paecilomyces_lilacinus_Thom_Samson)
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, 237, 173-195. <https://doi.org/10.1023/A:1013351617532>
- Hocking, P. J., Randall, P. J., Delhaize, E. y Keerthisinghe, G. (2000). The role of organic acids exuded from roots in phosphorus nutrition and aluminum tolerance in acidic soils. *International Atomic Energy Agency*, 31(33), 61-70. [https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig\\_q=RN:31039186](https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:31039186)
- Hocking, P. J. (2001). Organic acids exuded from roots in phosphorus uptake and aluminum tolerance of plants in acid soils. *Advances in Agronomy*, 74, 63-97. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(01\)74031-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(01)74031-X)
- Hyland, C., Ketterings, Q., Dewig, D., Stockin, K., Czymmek, K., Albrecht, G. y Geohring, L. (2005). Phosphorus basics - the phosphorus cycle. *Agronomy Fact Sheet Series*, Fact Sheet 12. Cornell University Cooperative Extension, 1-2. [https://www.researchgate.net/publication/283347230\\_Phosphorus\\_basics\\_-\\_the\\_phosphorus\\_cycle](https://www.researchgate.net/publication/283347230_Phosphorus_basics_-_the_phosphorus_cycle)
- Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria. (2017). *Variedad de maíz Los Diamantes 8843*, boletín técnico 6, 2° edición. <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/AV-1735.PDF>
- Jayadi, M., Baharuddin y Ibrahim, B. (2013). *In vitro* selection of rock phosphate solubility by microorganism from Ultisols in South Sulawesi, Indonesia. *American Journal of Agriculture and Forestry*, 1(4), 68-73. <http://dx.doi.org/10.11648/j.ajaf.20130104.14>
- Jog, R., Pandya, M., Nareshkumar, G. y Rajkumar, S. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology*, 160(4), 778-788. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074146-0>

- Jones, S. E. y Elliot, M. A. (2017). *Streptomyces* Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviors. *Trends in Microbiology*, 25(7), 522-531. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.001>
- Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Marschner, P., Greiner, R., Fernández, M. T., Romero, D., Menezes-Blackburn, D. y Mora, M. (2011). Identification of  $\beta$ -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(1), 163-172. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00995.x>
- Kafle, A., Cope, K. R., Raths, R., Yakha, J. K., Subramanian, S., Bücking, H. y García, K. (2019). Harnessing Soil Microbes to Improve Plant Phosphate Efficiency in Cropping Systems. *Agronomy*, 9(3), 127. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy9030127>
- Kongbrailatpam, B. y Putatunda, C. (2018). *In vitro* Phosphate Solubilization by *Bacillus subtilis* PSBN B4 obtained from Pineapple (*Ananas comosus*) rhizosphere. *International Journal of Applied Environmental Sciences*, 13(9), 833-842. <http://www.ripublication.com/>
- Krishnaraj, P. U. y Dahale, S. (2014). Mineral Phosphate Solubilization: Concepts and Prospects in Sustainable Agriculture. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 80(2), 389-405. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55116>
- Kumar, B. L. y Gopal, D. V. (2015). Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *3 Biotech*, 5(6), 867-876. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0293-6>
- Kumar, H., Franzetti, L., Kaushal, A. y Kumar, D. (2019). *Pseudomonas fluorescens*: a potential food spoiler and challenges and advances in its detection. *Annals of Microbiology*, 69, 873-883. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01501-7>
- Lee, K. Y., So, J. S. y Heo, T. R. (2001). Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level. *Journal of Microbiological Methods*, 45(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00214-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00214-7)
- Li, Y., Zhang, J., Zhang, J., Xu, W. y Mou, Z. (2019). Characteristics of Inorganic Phosphate-Solubilizing Bacteria from the Sediments of a Eutrophic Lake. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(2141), 1-15. <https://doi.org/10.3390/ijerph16122141>

- Maheswar, N. U. y Sathiyavani, G. (2012). Solubilization of phosphate by *Bacillus* sp., from groundnut rhizosphere (*Arachis hypogaea* L). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(8), 4007-4011. [https://www.researchgate.net/publication/289604933\\_Solubilization\\_of\\_phosphate\\_by\\_Bacillus\\_Sps\\_from\\_groundnut\\_rhizosphere\\_Arachishypogaea\\_L](https://www.researchgate.net/publication/289604933_Solubilization_of_phosphate_by_Bacillus_Sps_from_groundnut_rhizosphere_Arachishypogaea_L)
- Malhotra, H., Vandana, Sharma, S. y Pandey, R. (2018). Phosphorus Nutrition: Plant Growth in Response to Deficiency and Excess. In: Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H., Nahar, K., Hawrylak-Nowak, B. (eds). *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*. Springer, Singapore. 171-190. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8_7)
- Mamani-Herrada, J. (2017). *Pseudomonas* de rizósfera de palto (*Persea americana* mill.) con actividad biocontroladora de *Phytophthora cinnamomi* rands, aisladas en Costa Central del Perú [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio Institucional Universidad Agraria La Molina. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/2762>
- Matos, A., Gomes, I., Nietsche, S., Xavier, A., Gomes, W., Dos Santos Neto, J. y Pereira, M. (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 2947-2948. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160111>
- Maughan, H. y Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 789-797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>
- Meliani, A. y Bensoltane, A. (2015). Review of *Pseudomonas* attachment and biofilm formation in food industry. *Poultry, Fisheries and Wild Sciences*, 3(1), 1-7. <http://doi.org/10.4172/2375-446X.1000126>
- Mendes, R., Garbeva, P. y Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634-663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Mendes Dos Santos, R., Escobar-Díaz, P. A., Bentes-Lobo, L. L. y Rigobelo, E. C. (2020). Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Maize and Sugarcane: Characteristics and Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(136), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00136>

- Midekssa, M. J., Löscher, C. R., Schmitz, R. A. y Assefa, F. (2015). Characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria isolated from lentil growing areas of Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*, 9(25), 1637-1648. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7473>
- Miransari, M. (2013). Soil microbes and the availability of soil nutrients. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(11), 3075-3084. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1338-2>
- Monteiro, M. (2005). *La disponibilidad de fósforo evaluada por el método de Olsen en suelos ácidos por el método de Olsen en suelos ácidos de Portugal: significado agronómico y ambiental*. [Tesis doctoral, Universidad de Córdoba]. Repositório Científico do Instituto Politécnico de Castelo Branco. <http://hdl.handle.net/10400.11/156>
- Mora-López, M., López-Restrepo, D. A., Osorio-Echeverri, V. M. y Botero-Botero, L. R. (2023). Isolated yeasts from bioferments of mountain microorganism, an option for plant nutrition. *Agronomía Mesoamericana*, 34(3). <https://doi.org/10.15517/am.2023.52527>
- Moreno-Reséndez, A., García-Mendoza, V., Reyes-Castillo, J. L., Vásquez-Arroyo, J. y Cano-Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Moreno-Riaño, C. P. (2017). *Evaluación del antagonismo y sinergismo en aislados microbianos obtenidos de *Plukenetia Volúbilis* L para la conformación de un consorcio microbiano en condiciones in vitro*. [Tesis de licenciatura, Universidad de Santander]. Repositorio Digital UDES. <https://repositorio.udes.edu.co/handle/001/2844>
- Msimbira, L. A. y Smith, D. L. (2020). The Roles of Plant Growth Promoting Microbes in Enhancing Plant Tolerance to Acidity and Alkalinity Stresses. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(106), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00106>
- Muleta, D., Assefa, F., Börjesson, E. y Granhall, U. (2013). Phosphate-solubilizing rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12(1), 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2012.07.002>
- Müller, D. B., Vogel, C., Bai, Y. y Vorholt, J. A. (2016). The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annual Review of Genetics*, 50, 211-234. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-034952>

- Murphy, J. y Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Ng, C. W. W., Yan, W. H., Tsim, K. W. K., So, P. S., Xia, Y. T. y To, C. T. (2022). Effects of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* as the soil amendment. *Heliyon*, 8(11), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11674>
- Niu, Y. F., Chai, R. S., Jin, G. L., Wang, H., Tang, C. X. y Zhang, Y. S. (2013). Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. *Annals of Botany*, 112(2), 391-408. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs285>
- Ojo, O. I., Olajire-Ajayi, B. L., Dada, O. V. y Wahab, O. M. (2015). Effects of fertilizers on soil's microbial growth and populations: a review. *American Journal of Engineering Research*, 4(7), 52-61. <https://doi.org/10.6084/M9.FIGSHARE.1500822.V1>
- Oliveira, C. A., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Scotti, M. R., Carneiro, N. P., Guimarães, C. T., Schaffert, R. E., y Sá, N. M. H. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1782-1787. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.012>
- Omar, A. F., Abdelmageed, A. H. A., Al-Turki, A., Abdelhameid, N. M., Sayyed, R. Z., Rehan, M. (2022). Exploring the Plant Growth-Promotion of Four *Streptomyces* Strains from Rhizosphere Soil to Enhance Cucumber Growth and Yield. *Plants*, 11(3316), 1-19. <https://doi.org/10.3390/plants11233316>
- Osorio, N. W. y Habte, M. (2013). Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. *Biology and Fertility of Soils*, 49(4), 481-486. <http://doi.org/10.1007/s00374-012-0763-5>
- Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J. y Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6(745), 1-9. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745>

- Paredes-Mendoza, M. y Espinosa-Victoria, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamérica*, 28(1), 61-67. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57316076007>
- Park, K. H., Lee, C. Y. y Son, H. J. (2009). Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. *Letters in Applied Microbiology*, 49(2), 222-228. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02642.x>
- Patiño-Torres, C. O. (2010). *Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia* [Tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional UN. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/7293/9175001.2010.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G. y Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180-189. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H. y Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update. *Infection, Genetics and Evolution*, 57, 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>
- Pierzynski, G. M., McDowell, R. W. y Sims, J. T. (2005). Chemistry, cycling, and potential moment of inorganic phosphorus in soils. In: *Phosphorus: Agriculture and the Environment* (JT Sims, AN Sharpley, eds), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 53-86. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr46.c3>
- Prada-Salcedo, L. D., Prieto, C. y Franco-Correa, M. (2014). Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the Eastern Cordillera of the Colombian Andes. *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), 734-742. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5940>
- Prashar, P., Kapoor, N. y Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13, 63-77. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9317-z>

- Prieto-Correal, G. C., Prada-Salcedo, L. D., Cuervo, C. y Franco-Correa, M. (2015). Evaluación de la producción de ácidos orgánicos por *Streptomyces* spp. y solubilización de tres fuentes de fósforo por la cepa T3A. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 111-121. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.41667>
- Quinn, G. A., Banat, A. M., Abdelhameed, A. M. y Banat, I. M. (2020). *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of Medical Microbiology*, 69(8), 1040-1048. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.001232>
- Rafique, M., Sultan, T., Ortas, I. y Chaudhary, H. J. (2017). Enhancement of maize plant growth with inoculation of phosphate-solubilizing bacteria and biochar amendment in soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 63(5), 460-469. <https://doi.org/10.1080/00380768.2017.1373599>
- Ramírez, J. A., Parra, J. A. y Álvarez-Aldana, A. (2017). Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. *Mente Joven*, 6, 1-8. [https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente\\_joven.0.2017.3665](https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3665)
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., Pérez, Y., Díaz de la Osa, A., Lucia-Baldani, V. y Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 63-76. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181238817006>
- Richardson, A. E. y Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiology*, 156(3), 989-996. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>
- Rodríguez-Gacha, L. M. y Sánchez-Castro, N. (2018). *Selección y producción de bacterias solubilizadoras de fósforo empleando roca fosfórica como sustrato* [Tesis de licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Institucional Pontificia Universidad Javeriana. [https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/35220/Tesis%20correcciones%20finales%20\(1\).pdf?sequence=5](https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/35220/Tesis%20correcciones%20finales%20(1).pdf?sequence=5)
- Rooney, D. C. y Clipson, N. J. (2009). Phosphate addition and plant species alters microbial community structure in acidic upland grassland soil. *Journal of Microbiological Ecology*, 57, 4-13. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9399-2>
- Rosa, P. A., Mortinho, E. S., Jalal, A., Galindo, F. S., Buzetti, S., Fernandes, G. C., Barco-Neto, M., Pavinato, P. S. y Teixeira-Filho, M. C. (2020). Inoculation With Growth-Promoting Bacteria

- Associated with the Reduction of Phosphate Fertilization in Sugarcane. *Frontiers in Environmental Science*, 8(32), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00032>
- Saeid, A., Prochownik, E. y Dobrowolska-Iwanek, J. (2018). Phosphorus Solubilization by *Bacillus* Species. *Molecules*, 23(2897), 1-18. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23112897>
- Saez, J. M., Aparicio, J. D., Amoroso, M. J. y Benimeli, C. S. (2015). Effect of the acclimation of a *Streptomyces* consortium on lindane biodegradation by free and immobilized cells. *Process Biochemistry*, 50(11), 1923-1933. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.08.014>
- Safari-Sinegani, A. A. y Sedri, S. (2011). Effects of sterilization and temperature on the decrease kinetic of phosphorus bioavailability in two different soil types. *Journal Soil Science of Plant Nutrition*, 11(2), 109-122. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162011000200010>
- Salazar-Porras, L. M. (2015). *Calibración de dos métodos de diagnóstico de la fertilidad de suelos cultivados con yuca (Manihot esculenta crantz) en el trópico húmedo de Costa Rica*. [Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. Repositorio TEC. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/6465>
- Sánchez-Pérez, G. A., Ruíz-Chután, J. A., Berdúo-Sandoval, J. E., Gaitán-Fernández, I. C. y Sacbajá-Galindo, A. O. (2020). *Evaluación de la eficiencia de solubilización de fósforo de siete especies de microorganismos provenientes de suelos andisoles de Guatemala*. [Informe final, Universidad de San Carlos de Guatemala]. Biblioteca virtual DIGI-USAC. [https://www.google.com/url?client=internal-element-cse&cx=006344029051483238850:21igkjcvdtv&q=https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puicb/INF-2019-25.pdf&sa=U&ved=2ahUKEwia9Krs68OAAxXCUjUKHSKYDAkQFnoECAEQAQ&usg=AOvVaw0szJ3OQT\\_rciuz-wBN4qjZ](https://www.google.com/url?client=internal-element-cse&cx=006344029051483238850:21igkjcvdtv&q=https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puicb/INF-2019-25.pdf&sa=U&ved=2ahUKEwia9Krs68OAAxXCUjUKHSKYDAkQFnoECAEQAQ&usg=AOvVaw0szJ3OQT_rciuz-wBN4qjZ)
- Sano, T. y Nagata, T. (2008). Phosphate uptake and transport to plant cells. *Plant Membrane and Vacuolar Transporters*, 131-147. <https://doi.org/10.1079/9781845934026.0131>
- Sashidhar, B. y Podile, A. R. (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 1-12. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04654.x>

- Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E., Sadhana, B. y Satya Vani, S. (2017). Phosphorous and Phosphate Solubilizing Bacteria and their Role in Plant Nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 2133-2144. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.251>
- Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J. y Huffnagle, G. B. (2014). Microbiology, genomics and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species Complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 927-948. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00044-14>
- Schachtman, D. P., Reid, R. J. y Ayling, S. M. (1998). Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology*, 116(2), 447-453. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.447>
- Schweizer-Lassaga, S. (2011). Muestreo y análisis de suelos para diagnóstico de fertilidad. San José. CR: INTA/MAG. 1-19. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/P33-9965.pdf>
- Seaton, S. C. y Silby, M. W. (2014). Genetics and functional genomics of the *Pseudomonas fluorescens* group. In: Gross, D., Lichens-Park, A., Kole, C. (eds), *Genomics of Plant-Associated Bacteria*, 99-125. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3_5)
- Serna-Posso, E. J. (2015). *Evaluación de la producción de ácidos orgánicos en microorganismos rizosféricos y sus efectos en la solubilización de fosfatos*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional UNAL. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/55974>
- Shah, A., Shah, S. y Shah, V. (2021). Impact of flooding on the soil microbiota. *Environmental Challenges*, 4(100134), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100134>
- Shams El-Deen, R. O., Abd El-Azeem, S. A. M., Abd Elwahab, A. F., y Mabrouk, S. S. (2020). Effects of Phosphate Solubilizing Microorganisms on Wheat Yield and Phosphatase Activity. *Egyptian Journal of Microbiology*, 55(14<sup>th</sup> Conference of Applied Microbiology), 71-86. <https://doi.org/10.21608/ejm.2020.20675.1137>
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. y Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*, 2(587), 1-14. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

- Sharma, V., Sharma, A., Malannavar, A. B. y Salwan, R. (2020). Molecular aspects of biocontrol species of *Streptomyces* in agricultural crops. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, 89-109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00008-0>
- Sivasakthi, S., Kanchana, D., Usharani, G. y Saranraj, P. (2013). Production of Plant Growth Promoting Substance by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* Isolates from Paddy Rhizosphere Soil of Cuddalore District, Tamil Nadu, India. *International Journal of Microbiological Research*, 4(3), 227-233. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2013.4.3.75171>
- Ström, L. (1997). Root Exudation of Organic Acids: Importance to Nutrient Availability and the Calcifuge and Calcicole Behavior of Plants. *OIKOS*, 80(3), 459-466. <http://www.jstor.org/stable/3546618>
- Swain, M. R., Laxminarayana, K. y Ray, R. C. (2012). Phosphorus Solubilization by Thermotolerant *Bacillus subtilis* isolated from Cow Dung Microflora. *Agricultural Research*, 1, 273-279. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0022-x>
- Tapia-Torres, Y. y García-Oliva, F. (2013). La disponibilidad del fósforo es producto de la actividad bacteriana en el suelo en ecosistemas oligotróficos: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 31(3), 231-242. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018757792013000400231&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018757792013000400231&lng=es&tlng=es).
- Tapia-Torres, Y. y García-Oliva, F. (2016). Fósforo: la nueva arista de la crisis global ambiental. *OIKOS* =, 16, 22-24. <http://web.ecologia.unam.mx/oikos3.0/index.php/articulos/>
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M. y Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>
- Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S. y Liu, X. (2021). Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle. *Biology*, 10(2), 158. <https://doi.org/10.3390/biology10020158>
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T. y Singh, B. K. (2020). Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 607-621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>

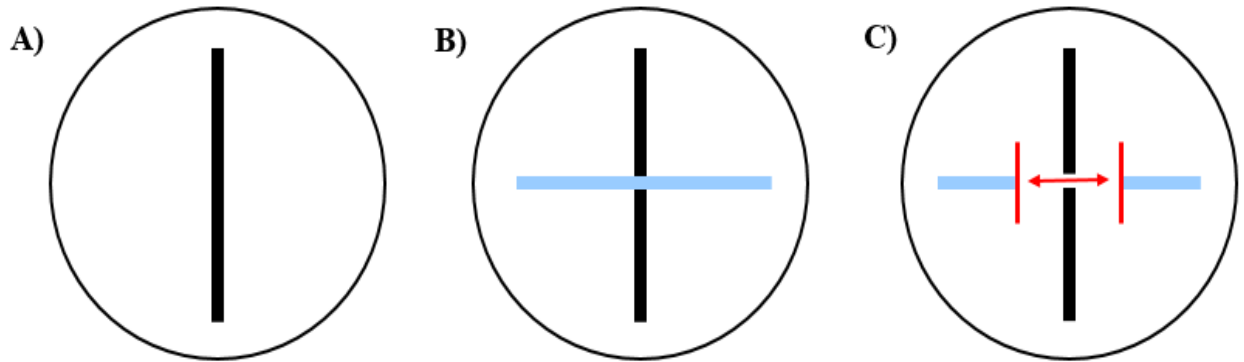
- Vahedi, R., Rasouli-Sadaghiani, M. H., Barin, M., Vetukuri, R. R. (2022). Effect of Biochar and Microbial Inoculation on P, Fe, and Zn Bioavailability in a Calcareous Soil. *Processes*, 10(343), 1-14. <https://doi.org/10.3390/pr10020343>
- Vargas Barrantes, P. y Castro Barquero, L. (2018). Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo de Andisoles de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 43(1), 47-68. <https://doi.org/10.15517/rac.v43i1.35649>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., De los Santos-Villalobos, S. (2017). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Vyas, P. y Gulati, A. (2009). Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology*, 9(174). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-174>
- Wang, J., Li, Q., Xu, S., Zhao, W., Lei, Y., Song, C. y Huang, Z. (2018). Traits-Based Integration of Multi-Species Inoculants Facilitates Shifts of Indigenous Soil Bacterial Community. *Frontiers in Microbiology*, 9(1692), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01692>
- Wiegand, I., Hilpert, K. y Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Yadav, A., Yadav, K. y Vashistha, A. (2016). Phosphate solubilizing activity of *Pseudomonas fluorescens* PSM1 isolated from wheat rhizosphere. *Journal of Applied and Natural Science*, 8(1), 93-96. <https://doi.org/10.31018/jans.v8i1.754>
- Yauyo-Landeo, M. I. (2015). *Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fósforo sobre el crecimiento y nutrición de frijol castilla, maíz, trigo y haba*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio Institucional Universidad Nacional Agraria La Molina. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/1628>
- Zhang, S., Merino, N., Okamoto, A. y Gedalanga, P. (2018). Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. *Microbial Biotechnology*, 11(5), 833-847. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13300>

Zhu, F., Qu, L., Hong, X. y Sun, X. (2011). Isolation and Characterization of a Phosphate-Solubilizing Halophilic Bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the Coast of Yellow Sea of China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(615032), 1-6. <https://doi:10.1155/2011/615032>

## 10. ANEXOS

### Anexo 1

*Prueba de antagonismo mediante técnica de estría cruzada*



*Nota.* A) estriado vertical de la primera cepa; B) estriado horizontal de la segunda cepa; y C) presencia de antagonismo por inhibición del crecimiento

## Anexo 2

### Cálculos para determinar la necesidad de fertilización

---

#### Estimación del peso de la hectárea:

$$\frac{1.2 \text{ g}}{\text{cm}^3} \times \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} \times \frac{100 \text{ cm} \times 100 \text{ cm} \times 100 \text{ cm}}{1 \text{ m}^3} = 1\,200 \text{ kg/m}^3$$

$$10\,000 \text{ m}^2 \times 0.30 \text{ m} = 3\,000 \text{ m}^3$$

$$1\,200 \text{ kg/m}^3 \times 3\,000 \text{ m}^3 = 3\,600\,000 \text{ kg}$$

<b>Nitrógeno</b>	<b>Fósforo</b>	<b>Potasio</b>
<b>Fuente:</b> Urea (46%)	<b>Fuente:</b> Roca fosfórica (30%)	<b>Fuente:</b> Cloruro potasio (60%)
<b>Dosis a aplicar:</b> 100 kg/ha	<b>Dosis a aplicar:</b> 60 kg/ha	<b>Dosis a aplicar:</b> 40 kg/ha
<b>Aporte de nitrógeno</b>	<b>Transformación a óxidos</b>	<b>Transformación a óxidos</b>
100 kg urea → 46 kg N	60 x 2.29 = 137.4	40 x 1.20 = 48
x kg urea → 100 kg N		
217.4 kg urea/ha		
	<b>Aporte de fósforo</b>	<b>Aporte de potasio</b>
<b>Dosis por maceta</b>	100 kg roca → 30 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	100 kg KCl → 60 kg K <sub>2</sub> O
217.4 kg urea → 3 600 000 kg	x kg roca → 137.4 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	x kg KCl → 48 kg K <sub>2</sub> O
x kg urea → 18 kg	458 kg roca fosfórica/ha	80 kg KCl/ha
1.09 g de urea por maceta		
<b>Fraccionamiento del N</b>	<b>Dosis por maceta</b>	<b>Dosis por maceta</b>
1.09 g urea → 100%	458 kg roca → 3 600 000 kg	80 kg KCl → 3 600 000 kg
x g urea → 25%	x kg roca → 18 kg	x kg KCl → 18 kg
0.27 g urea a la siembra	2.29 g de roca por maceta a	0.4 g de KCl por maceta a
0.82 g urea 22 días después	la siembra	la siembra

---

### Anexo 3

Cálculos para obtener dosis de inoculación a aplicar mediante técnica de dilución en placa

#### Conteo de colonias de *B. subtilis* a la dilución $10^{-4}$

Conteo alto: 66 colonias

Conteo medio: 52 colonias

Conteo bajo: 45 colonias

**Total:** 163 colonias

**Promedio:**  $163/3 = 54,33$

#### Cálculo de cultivos requeridos

Factor de dilución:  $54,33 \times 65 = 3531,66$

$3531,66 \times 10\,000/0,25\text{ ml} = 141.266.400\text{ UFC/ml}$

1 placa  $\longrightarrow$  141.266.400 UFC/ml

x placas  $\longrightarrow$  100.000.000 ( $1 \times 10^8$ )

0.7 placas Petri

#### Cálculo de placas necesarias para concentración requerida ( $1 \times 10^8$ )

$141.266.400/100\,000\,000 \times 10\text{ ml} = 14,12664\text{ ml}$

14,12664 ml  $\longrightarrow$  0.7 placas

100 ml  $\longrightarrow$  x placas

4.9 placas Petri

#### Cálculo para determinar la dosis de inoculación

1 maceta  $\longrightarrow$  100 ml/bacteria

16 macetas  $\longrightarrow$  x ml/bacteria

1600 ml/bacteria

## Anexo 4

Tabla de correlaciones de Pearson ( $p < 0.05$ ) entre la cantidad de P solubilizado y el pH en medio

NBRIP líquido en los cinco días (5d) de evaluación

1d	2d	3d	4d	5d
-0.911	-0.961	-0.928	-0.952	-0.921

Nota. Valores de correlación general, independientemente del tratamiento

## Anexo 5. ANOVA de mediciones repetidas en el tiempo para la concentración de P en el suelo

### Fit measurements

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2 0	R2 1
180	427.85	573.11	-163.92	0.69	0.31	0.78

Smaller AIC and BIC is better

### Marginal hypothesis testing (Type III SS)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	108	14509.08	<0.0001
Tratamiento	8	27	1.14	0.3694
Mes	4	108	2.89	0.0259
Tratamiento:Mes	32	108	2.83	<0.0001

### Pruebas de hipótesis tipo III - prueba

	Source	numDF	denDF	F-value	p-value
1	Tratamiento	8	27	1.14	0.3694
2	Mes	4	108	2.89	0.0259
3	Tratamiento:Mes	32	108	2.83	<0.0001

### Random effects parameters

Covariance model for random effects: pdIdent

Formula: ~1|Sujeto

Standard deviations and correlations

(const)	
(const)	0.70

## Variance structure

Variance model: varIdent

Formula: ~ 1 | Cluster

Variance-function parameters

Parameter	Estim.
1	1.00
2	0.64
3	0.78
4	0.52

## P - Adjusted means and standard error for the levels of Tratamiento\*Mes

DGC (Alpha:=0.05)

p-value correction procedure: No

Tratamiento	Mes	Means	S.E.	
St	M1	16.00	0.39	A
St	M2	15.75	0.39	B
Bs+St	M1	15.50	0.41	B
Bs+St	M3	15.50	0.41	B
Pf+Bs+St	M3	15.50	0.44	B
T. qui	M2	15.50	0.49	B
T. qui	M4	15.50	0.49	B
St	M3	15.50	0.39	B
Pf+Bs+St	M4	15.25	0.44	B
Pf+Bs+St	M5	15.25	0.44	B
Pf+Bs	M1	15.25	0.44	B
Bs+St	M2	15.00	0.41	B
Bs+St	M4	15.00	0.41	B
T. qui	M1	15.00	0.49	B
Pf+Bs+St	M1	15.00	0.44	B
Pf	M2	15.00	0.41	B
T. qui	M3	15.00	0.49	B
Pf+Bs	M3	15.00	0.44	B
Pf	M5	15.00	0.41	B
T. qui	M5	15.00	0.49	B
Bs+St	M5	14.75	0.41	B
Pf+St	M3	14.75	0.49	B
Pf+Bs	M5	14.75	0.44	B
Pf	M1	14.75	0.41	B
Pf+Bs	M4	14.75	0.44	B
Pf	M4	14.75	0.41	B
St	M4	14.75	0.39	B
Pf+St	M1	14.50	0.49	B
T. abs	M1	14.50	0.39	B
T. abs	M5	14.50	0.39	B
T. abs	M4	14.50	0.39	B
T. abs	M2	14.50	0.39	B
T. abs	M3	14.50	0.39	B
Bs	M3	14.50	0.49	B
Bs	M1	14.25	0.49	B
Pf+Bs+St	M2	14.25	0.44	B
Pf+Bs	M2	14.25	0.44	B

Pf+St	M5	14.25	0.49	B
Pf+St	M4	14.25	0.49	B
Pf	M3	14.25	0.41	B
Bs	M4	14.25	0.49	B
St	M5	14.25	0.39	B
Pf+St	M2	14.00	0.49	B
Bs	M5	14.00	0.49	B
Bs	M2	13.75	0.49	B

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0.05$ )

## Anexo 6. ANOVA de mediciones repetidas en el tiempo para el pH del suelo

### Results for model: lmm.model.005\_pH\_REML

Dependent variable: pH

#### Fit measurements

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
180	-577.82	-432.56	338.91	0.02	0.70	0.99

Smaller AIC and BIC is better

#### Marginal hypothesis testing (Type III SS)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	108	368767.04	<0.0001
Tratamiento	8	27	2.42	0.0412
Mes	4	108	908.45	<0.0001
Tratamiento:Mes	32	108	16.70	<0.0001

#### Pruebas de hipótesis tipo III - prueba

	Source	numDF	denDF	F-value	p-value
1	Tratamiento	8	27	2.42	0.0412
2	Mes	4	108	908.45	<0.0001
3	Tratamiento:Mes	32	108	16.70	<0.0001

#### Random effects parameters

Covariance model for random effects: pdIdent

Standard deviations and correlations

	(const)
(const)	0.06

## Variance structure

Variance model: varIdent

Formula: ~ 1 | Cluster

Variance-function parameters

Parameter	Estim.
1	1.00
3	0.49
4	0.33
2	0.15

## pH - Adjusted means and standard error for the levels of Tratamiento\*Mes

DGC (Alpha:=0.05)

p-value correction procedure: No

Tratamiento	Mes	Means	S.E.			
Pf+Bs+St	M1	5.81	0.03	A		
Pf+Bs	M1	5.78	0.03		B	
T.abs	M1	5.77	0.03		B	
Pf+Bs+St	M2	5.77	0.03		B	
Pf	M1	5.76	0.03		B	
Bs+St	M1	5.76	0.03		B	
T.abs	M2	5.75	0.03		B	
Bs	M1	5.74	0.03			C
T.abs	M3	5.73	0.03			C
Pf+St	M1	5.72	0.03			C
St	M1	5.72	0.03			C
Pf+Bs	M2	5.72	0.03			C
T.abs	M4	5.71	0.03			C
Pf	M2	5.71	0.03			C
Bs+St	M2	5.70	0.03			C
T.abs	M5	5.69	0.03			C
St	M2	5.69	0.03			C
Pf+Bs+St	M3	5.68	0.03			C
Bs	M2	5.68	0.03			C
T.qui	M1	5.67	0.03			C
Pf+St	M2	5.67	0.03		C	
Pf	M3	5.66	0.03			D
Pf+Bs+St	M4	5.65	0.03			D
Pf+Bs	M3	5.64	0.03			D
Bs+St	M3	5.64	0.03			D
T.qui	M2	5.62	0.03			D
Bs	M3	5.62	0.03			D
Pf+Bs+St	M5	5.62	0.03			D
St	M3	5.62	0.03			D
Pf+Bs	M4	5.61	0.03			D
Pf	M4	5.61	0.03			D
Bs+St	M4	5.60	0.03			D
Pf+St	M3	5.60	0.03		D	
St	M4	5.59	0.03			E
T.qui	M3	5.58	0.03			E
Pf+Bs	M5	5.58	0.03			E
Bs	M4	5.58	0.03			E
St	M5	5.57	0.03			E
Bs+St	M5	5.57	0.03			E
Pf	M5	5.56	0.03			E
Pf+St	M4	5.56	0.03			E

Bs	M5	5.56	0.03	E
T. qui	M4	5.55	0.03	E
Pf+St	M5	5.53	0.03	E
T. qui	M5	5.52	0.03	E

Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0.05$ )

## Anexo 7

Tabla de correlaciones de Pearson ( $p < 0.05$ ) entre el cambio en la concentración de P disponible y el pH en el suelo

Tratamiento	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5
T. abs	0.147	0.319	0.120	0.043	0.045
	p = 0.852	p = 0.680	p = 0.879	p = 0.956	p = 0.954
T. qui	- 0.979	- 0.939	- 0.828	- 0.983	- 0.552
	p = 0.019	p = 0.060	p = 0.171	p = 0.017	p = 0.447
Pf	0.905	0.980	0.613	0.813	0.410
	p = 0.094	p = 0.019	p = 0.386	p = 0.186	p = 0.589
Bs	0.145	0.464	0.033	0.420	N/A
	p = 0.854	p = 0.535	p = 0.966	p = 0.579	
St	0.316	0.870	0.8	1	0.944
	p = 0.683	p = 0.129	p = 0.2	p < 2.2e-16	p = 0.056
Pf + Bs	0.619	0.676	0.992	0.851	0.694
	p = 0.381	p = 0.324	p = 0.007	p = 0.148	p = 0.306
Pf + St	0.175	0.774	0.388	0.837	0.837
	p = 0.824	p = 0.226	p = 0.611	p = 0.162	p = 0.162
Bs + St	0.141	0.620	0.242	0.470	0.458
	p = 0.858	p = 0.380	p = 0.757	p = 0.529	p = 0.541
Pf + Bs + St	0.202	0.330	0.141	0.435	0.814
	p = 0.797	p = 0.670	p = 0.858	p = 0.564	p = 0.185