

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMIA



**“EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON MICROORGANISMOS
SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO SOBRE EL CRECIMIENTO Y
NUTRICIÓN DE FRIJOL CASTILLA, MAÍZ, TRIGO Y HABA”**

Presentado por:

MARY ISABEL YAUYO LANDEO

Tesis para optar el título profesional de:

INGENIERO AGRÓNOMO

Lima - Perú

2015

F03.
Y3
T

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Formas de fósforo en el suelo.....	4
2.1.1. Fósforo orgánico	4
2.1.2. Fósforo inorgánico	4
2.2. Características de los suelos para un efectivo proceso de solubilización	5
2.3. Mecanismos para la solubilización de fósforo.....	7
2.3.1. Mineralización de fósforo orgánico por fosfatasas	7
2.3.2. Solubilización de fósforo inorgánico por ácidos.....	8
2.4. Microorganismos solubilizadores de fósforo.....	13
2.4.1. Bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos.....	13
2.4.2. Hongos solubilizadores de fosfatos.....	13
2.5. Efectos producidos en diferentes cultivos por la aplicación de microorganismos solubilizadores de fósforo	15
2.6. Métodos utilizados para la inoculación de microorganismos solubilizadores de fósforo inorgánico en condiciones de campo e invernadero....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Ubicación.....	21
3.2. Cultivos indicadores	21
3.3. Microorganismos experimentales.....	22
3.4. Suelo	23
3.5. Materiales	26
3.5.1. Fase de invernadero.....	26
3.5.2. Fase de laboratorio.....	26
3.6. Descripción de los tratamientos.....	27

43953

3.6.1.	Cepas microbianas	27
3.6.2.	Aplicación de fósforo inorgánico.....	27
3.7.	Metodología y procedimiento.....	28
3.7.1.	Colecta, preparación y muestreo del suelo.....	28
3.7.2.	Preparación de las macetas.....	28
3.7.3.	Aplicación del fósforo inorgánico.....	28
3.7.4.	Inoculación de las cepas microbianas	29
3.7.5.	Siembra y desahije	29
3.7.6.	Fertilización y riego	29
3.7.7.	Cosecha	30
3.7.8.	Determinación de fósforo.....	31
3.8.	Análisis estadístico	32
IV.	RESULTADOS.....	33
4.1.	Resultados en el cultivo de maíz	33
4.2.	Resultados en el cultivo de frijol castilla.....	36
4.3.	Resultados en el cultivo de haba.....	39
4.4.	Resultados en el cultivo de trigo.....	42
V.	DISCUSIÓN	46
VI.	CONCLUSIONES.....	50
VII.	RECOMENDACIONES.....	51
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	52
IX.	ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1: Principales formas de fosfato inorgánico en los suelos.....	5
Cuadro 2: Principales microorganismos solubilizadores de fosfato según las condiciones fisicoquímicas del suelo	6
Cuadro 3: Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)	12
Cuadro 4: Bacterias y hongos con capacidad de solubilizar fósforo.....	14
Cuadro 5: Principales métodos de aplicación de microorganismo solubilizadores de fósforo	20
Cuadro 6: Descripción del aislamiento, selección y caracterización de los microorganismos empleados en ensayo	24
Cuadro 7: Características físicas y químicas del suelo empleado en las macetas.....	25
Cuadro 8: Descripción de las dosis de P y cepas microbianas empleadas en los tratamientos del ensayo	27
Cuadro 9: Distribución de grados de libertad por fuente de variación.....	32
Cuadro 10: Efecto de la inoculación de tres cepas bacterianas y una fúngica y de la aplicación de roca fosfórica sobre la altura, peso fresco, seco y la extracción de fósforo por plantas de maíz.....	34
Cuadro 11: Efecto de la inoculación de tres cepas bacterianas y una fúngica y de la aplicación de roca fosfórica sobre la altura, peso fresco, seco y la extracción de fósforo por plantas de frijol.....	37
Cuadro 12: Efecto de la inoculación de tres cepas bacterianas y una fúngica y de la aplicación de roca fosfórica sobre la altura, peso fresco, seco y la extracción de fósforo por plantas de haba.	40
Cuadro 13: Efecto de la inoculación de tres cepas bacterianas y una fúngica y de la aplicación de roca fosfórica sobre la altura, peso fresco, seco, peso de granos y la extracción de fósforo por plantas de trigo.....	43
Cuadro 14: Solubilización de fosfato tricálcico y roca fosfórica en medio líquido por las cepas microbianas.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre el peso seco por plantas de maíz.....	35
Figura 2: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre la extracción de fósforo por plantas de maíz.....	35
Figura 3: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre el peso seco por plantas de frijol castilla.....	38
Figura 4: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre la extracción de fósforo por plantas de frijol castilla.	38
Figura 5: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre el peso seco por plantas de haba	41
Figura 6: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre la extracción de fósforo por plantas de haba.....	41
Figura 7: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre el peso seco por plantas de trigo	44
Figura 8: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre la extracción de fósforo por plantas de trigo.....	45
Figura 9: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre el peso de granos por plantas de trigo	45
Figura 10: Variación de la concentración de P soluble en medio nutritivo adicionado con fosfato tricálcico y roca fosfórica (Álvarez 2012).....	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Pág.

ANEXO 1: ANVA de altura de la biomasa aérea en maíz.....	67
ANEXO 2: ANVA de materia fresca de la biomasa aérea en maíz.....	67
ANEXO 3 : ANVA de materia seca de la biomasa aérea en maíz.....	67
ANEXO 4: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa aérea en maíz.....	67
ANEXO 5 : ANVA de altura de la biomasa aérea en frijol	68
ANEXO 6 : ANVA de materia fresca de la biomasa aérea en frijol.....	68
ANEXO 7 : ANVA de materia seca de la biomasa aérea en frijol	68
ANEXO 8: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa aérea en frijol	68
ANEXO 9: ANVA de altura de la biomasa aérea en haba.....	68
ANEXO 10: ANVA de materia fresca de la biomasa aérea en haba	69
ANEXO 11: ANVA de materia seca de la biomasa aérea en haba.....	69
ANEXO 12: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa aérea en haba.....	69
ANEXO 13: ANVA de altura de la biomasa aérea en trigo.....	69
ANEXO 14: ANVA de materia fresca de la biomasa aérea en trigo	69
ANEXO 15: ANVA de materia seca de la biomasa aérea en trigo.....	70
ANEXO 16: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa aérea en trigo.....	70
ANEXO 17: ANVA de peso de granos en trigo	70
ANEXO 18: Composición del medio de Pikovskaya PKV	70
ANEXO 19: Curva patrón de fósforo.....	71
ANEXO 20: Descripción de los suelos utilizados para el aislamiento	72

RESUMEN

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. A pesar de ser abundante en los suelos, su disponibilidad para las plantas es muy limitada debido a la baja solubilidad de los compuestos fosfatados que se presentan en el suelo. Muchos microorganismos tienen potencial para disolver minerales fosfatados e incrementar la disponibilidad de este elemento. El presente trabajo de investigación fue realizado en el Invernadero de Fertilidad de Suelos, de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), con el objetivo de evaluar el efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. y *Penicillium* sp., sobre la extracción de P aplicado en forma de roca fosfórica de Bayóvar y producción de biomasa por los cultivos de frijol castilla, maíz, trigo y haba cultivados en un suelo calcáreo. Los parámetros evaluados fueron: altura, biomasa fresca y seca, extracción de P y peso de granos en trigo. Los MSF aislados a nivel *In vitro* fueron inoculados al momento de la siembra, los resultados encontrados fueron analizados para cada cultivo a través del diseño completo al azar con arreglo factorial de 2 niveles de P (0 y 200 mg kg⁻¹) y cuatro cepas, los promedios fueron sometidos al análisis de variancia y comparados mediante la prueba de comparación de medias HSD Tukey.

Los resultados encontrados para la altura de planta (cm) en los cultivos de maíz, haba y trigo fueron favorables ya que se encontró diferencia estadística, para la biomasa fresca y seca (g maceta⁻¹) se encontró diferencia estadística solo para los cultivos de maíz y trigo, mientras que para la extracción de P (g maceta⁻¹) no se encontró diferencia estadística en los cultivos evaluados, para el peso de granos en el cultivo de trigo sí presentó diferencia estadística siendo la mejor cepa *Bacillus* sp., con respecto a las demás cepas.

De los resultados encontrados y bajo las condiciones donde se realizó el ensayo se puede concluir que la inoculación de las tres cepas bacterianas y una cepa fúngica no afectó la extracción de P en los cultivos ensayados, pero sí incrementó la producción de biomasa aérea en los cultivos de maíz y trigo. Ninguno de los MSF ensayados tiene potencial para solubilizar el P aplicado en forma de roca fosfórica de Bayóvar.

Trabajos a futuro con MSF deben estar enfocados en determinar el nivel de población a inocular para solubilizar fosfatos de calcio, además se recomienda hacer aplicaciones de materia orgánica o fuentes de azúcares al suelo para la alimentación de microorganismos, y también se debe usar acidificantes en el suelo para ayudar a los microorganismos a solubilizar fosfatos de calcio que tienen una constante de producto de solubilidad alta (K_{ps}), como la roca fosfórica.

Palabras clave: MSF, roca fosfórica de Bayóvar, suelo calcáreo, k_{ps} y fósforo.

I. INTRODUCCIÓN

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, al formar fosfatos orgánicos que desempeñan un papel esencial en los procesos de transferencia de energía y el metabolismo (Salazar, 2005). El fósforo es comúnmente un nutriente limitante tanto para los ecosistemas terrestres como acuáticos (Cramer, 2010). Una insuficiencia de fósforo en el suelo puede influir en el retraso de la madurez y desarrollo de la planta, retrasando la cosecha y disminuyendo los rendimientos.

El contenido medio de fósforo en los suelos es de aproximadamente 0.05% en peso (Illmer y Schinner, 1995), pero solo una fracción que oscila entre 0.03 a 0.3 mg/L se encuentra en solución, por lo cual este nutriente debe ser reemplazado varias veces desde las fracciones lábiles del suelo para asegurar la óptima nutrición de los vegetales.

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos desarrollan un papel importante en incrementar la movilización y disponibilidad de P hacia las raíces de las plantas; además presentan ventajas frente a fertilizantes químicos pues colaboran con la preservación del medio ambiente, ya que no implican sustancias tóxicas que afecten el sistema, generando de esta manera una agricultura sostenible (Chen *et al.*, 2005) y además hacen parte de la flora nativa en los suelos y materia orgánica.

El presente trabajo busca determinar el efecto de la inoculación con microorganismos que solubilizan fósforo en un suelo en donde predomina el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, ya que en el país se cuenta con una superficie extensa de suelos que son calcáreos, para que de esta forma el fósforo esté disponible para la planta.

La mayoría de los suelos agrícolas contienen grandes reservas de fósforo (P), una parte considerable es consecuencia de aplicaciones regulares de fertilizantes de P, sin embargo la mayor parte se encuentra en forma de fosfatos insolubles. El fósforo es frecuentemente provisto mediante fertilizantes solubles, sin embargo, el precio de estos se ha incrementado debido a que las reservas de fósforo se están agotando por la falta de reposición natural, y porque el fósforo se extrae a una tasa muy superior a su capacidad de recuperación. Marruecos, China, Sudáfrica y EE.UU acumulan el 83% del fosfato

mineral explotable, el ritmo de extracción actual de las reservas es mayor por ello es probable que se agote dentro de 125 años (Vaccari, 2009).

Dado que las reservas de fósforo son limitadas, es necesario desarrollar nuevas técnicas para el uso más eficiente del fósforo nativo del suelo o del aplicado mediante la fertilización. En la actualidad hay abundante investigación sobre el potencial de microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF), tanto en suelos ácidos como alcalinos. Los MSF son importantes para incrementar la disponibilidad de P nativo del suelo y del P aplicado en forma de fuentes poco solubles como la roca fosfórica de Bayóvar, En nuestro país sin embargo, la información es aún escasa, especialmente en sistemas productivos de bajos insumos.

De acuerdo a las experiencias mencionadas, se propone que la inoculación con cepas de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato en suelos calcáreos, puede incrementar la producción de biomasa (crecimiento) y la extracción de P por las plantas. Es por ello que se plantea el presente trabajo de investigación a nivel de invernadero, con los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Evaluar la factibilidad del uso de microorganismos con potencial de solubilización de fosfato en la provisión de fósforo para cultivos anuales.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. y *Penicillium* sp. sobre la producción de biomasa por los cultivos de frijol castilla, maíz, trigo y haba cultivados en un suelo calcáreo.
- Evaluar el efecto de la inoculación anterior sobre la extracción de P de los cultivos mencionados.
- Determinar el potencial de los microorganismos mencionados para solubilizar el P aplicado en forma de roca fosfórica de Bayóvar.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El fósforo es uno de los principales nutrientes, después del nitrógeno (N), es el segundo nutriente inorgánico necesario para todas las formas de vida. Una mayor parte del fósforo en el suelo, aproximadamente 95 - 99 % está presente en forma de fosfatos insolubles y no puede ser utilizada por las plantas (Vassileva *et al.*, 1998). Para aumentar la disponibilidad de fósforo en el suelo se tiene que aplicar grandes cantidades de fertilizante, pero una gran proporción del fósforo aplicado en los fertilizantes es rápidamente transformado a la forma insoluble (Omar, 1998); Por lo tanto el fósforo aplicado en forma de fertilizante está disponible en baja proporción para las plantas (Abd Alla, 1994).

Las deficiencias de fósforo están muy extendidas en suelos de todo el mundo y esto representa que los fertilizantes de fósforo tengan un costo importante para la producción agrícola, esto se va agravando con el tiempo ya que las reservas de fósforo se van agotando por intensificación agrícola y por el mal uso que se le da a los fertilizantes fosfatados, las consecuencias de la posible escasez de fósforo afectan directamente a la seguridad alimentaria es por este motivo que el fósforo debe aplicarse en la agricultura de forma más eficiente. Al mismo tiempo, se debe recuperar y reutilizar gran parte del fósforo que contienen los residuos de cultivos, alimentos, abonos y de otras fuentes. Si no se hace nada, la producción de alimentos corre el riesgo de decrecer dramáticamente en el futuro, generando de paso sustanciales incrementos en el precio de los fertilizantes, el aumento de los impactos ambientales de la contaminación, la energía y el consumo de recursos, menores rendimientos de las cosechas, mayores riesgos para la subsistencia de los agricultores y, como corolario, la reducción de la seguridad alimentaria. El fósforo será un recurso cada vez más escaso y en un futuro próximo probablemente ya no habrá fertilizante de fósforo barato.

2.1. FORMAS DE FÓSFORO EN EL SUELO

2.1.1. Fósforo orgánico

El fósforo orgánico está compuesto por varias fracciones, desde las más lábiles hasta las más resistentes a la mineralización. No obstante, el componente orgánico central del ciclo del fósforo es la biomasa microbiana, la cual es la fracción lábil controlada por factores ambientales y por aquellos relacionados con el manejo de los suelos. Estudios relacionados por Piconne *et al.*, (2001) en una pastura mixta fertilizada con distintas dosis de P, indicaron el contenido de la biomasa microbiana de 29 mg kg⁻¹ de P en los primeros 15 cm de suelo y representa el 5% del P orgánico total.

El fósforo orgánico proviene de restos vegetales y animales que al ser degradados por los microorganismos del suelo liberan compuestos fosfatados, constituye del 29 al 65% del fósforo presente en la superficie del suelo, la mayoría en compuestos de bajo peso molecular (Arzuaga *et al.*, 2005). Este tipo de fósforo tiende a ser adsorbido sobre las arcillas, por lo cual se podría esperar contenidos superiores de fósforo orgánico en suelos arcillosos que en arenosos o francos.

Las principales formas de fosfatos orgánicos son el fosfato de inositol y los ácidos nucleicos los cuales tienen origen principalmente microbiano. El nivel de fósforo orgánico en los suelos puede variar entre un 3 y un 85% del fósforo total.

2.1.2. Fósforo inorgánico

El fósforo se encuentra formando parte de minerales, los más importantes son las apatitas, la strengita y la variscita (Cuadro 1), que pueden liberar fósforo muy lentamente por meteorización.

El fósforo del suelo se presenta casi exclusivamente como ortofosfatos derivados del ácido fosfórico, H₃PO₄, Ca y Al. Los compuestos formados pueden encontrarse en forma de sales en solución, sales cristalinas o sales absorbidas por los coloides del suelo. El ión fosfato puede, además, ser directamente absorbido por los coloides del suelo o puede formar enlaces de gran estabilidad con los hidróxidos de Fe, Al o Mn que forma parte de coloides del suelo.

Cuadro 1: Principales formas de fosfato inorgánico en los suelos

Mineral	Denominación	Composición	Características
Fosfatos de calcio	Hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$	Mayor abundancia
	Oxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaO}$	
	Fluorapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaF}_2$	Mayor abundancia
	Carbonatoapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaCO}_3$	
	Fosfato tricálcico	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	
	Fosfato bicálcico	CaHPO_4	Mayor solubilidad
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	Mayor solubilidad
Fosfatos de hierro	Vivianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	
	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
Fosfato de aluminio	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	

Fuente: Tsai y Rosetto, 1992

2.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS PARA UN EFECTIVO PROCESO DE SOLUBILIZACIÓN

Los microorganismos solubilizadores de fosfato se caracterizan por ser aerobios, pero cabe resaltar que también existen algunos microorganismos mesófilos, heterótrofos y facultativos con esta capacidad de solubilización de fosfato.

En condiciones de campo, la efectividad de los inoculantes depende de la capacidad de los aislados para colonizar la rizósfera y mantener alta actividad. Las características que se han identificado como importantes para la competencia de los aislados inoculadas en la rizosfera incluyen: motilidad, alta tasa de crecimiento, habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B₁, habilidad para utilizar ácidos orgánicos y ciertas proteínas de superficie celular, así como una rápida adaptación a las condiciones cambiantes del ambiente edáfico (Marschner, 2007). Con relación a las condiciones del suelo, la estabilidad y el adecuado desempeño de las bacterias solubilizadoras de fosfato, éstas se ven altamente influenciadas por factores tales como pH, salinidad y temperatura, entre otros, especialmente bajo condiciones de estrés (Sharan *et al.*, 2008; Trivedi y Sa, 2008; Cuadro 2).

Cuadro 2: Principales microorganismos solubilizadores de fosfato según las condiciones fisicoquímicas del suelo

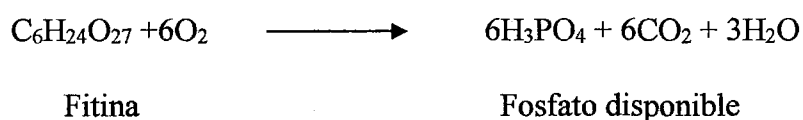
Cultivo	pH	Tipo de suelo	Temperatura (°C)	Concentración de P (ppm)	Microorganismos solubilizadores de fosfato
Trigo	5.5 - 7.0	Arcilloso	11-18	35 - 50	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Mesorhizobium mediterraneum</i> .
Maíz	6.6 - 7.4	Arcilloso (rico en MO)	25 - 30	35 - 50	Ídem
Remolacha	5.5 - 6.5	Arcilla arenosa	13 -16	35 - 50	Ídem
Tomate	5.8 - 6.8	Arcilloso (rico en MO)	15 - 29	35 - 50	Ídem
Algodón	6.2 - 7.2	Arcilloso	27 - 30	35 - 50	Ídem
Alfalfa	> 6.5	Arcilloso	28 - 30	35 - 50	
Manzana	4.5 - 9.0	Arenoso	15 - 25	20 - 30	<i>Rhizobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Rhizobium</i> .
Naranja	5.5 - 7.0	Arenoso	13 - 30	20 - 30	<i>Rhizobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Rhizobium</i> .

Fuente: Dakora y Phillips, (2002); Fernández *et al.*, (2005)

2.3. MECANISMOS PARA LA SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO

2.3.1. Mineralización de fósforo orgánico por fosfatasa

La mineralización es la conversión microbiana de P orgánico a H_2PO_4^- o HPO_4^{2-} (ortofosfato), que son formas de fósforo disponibles para las plantas. El P orgánico puede ser mineralizado como subproducto de la mineralización de la materia orgánica del suelo o mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por la demanda de este nutriente (Piconne y Zamuner, 2002). Este proceso está mediado por las enzimas fosfatasa que pueden ser sintetizadas por las raíces de las plantas, las cuales producen fosfatasa ácida (Ridge y Rovira, 1971), como por los hongos y bacterias capaces de producir fosfatasa ácida y alcalina. Entre los compuestos orgánicos del fósforo que comúnmente pueden estar presentes en el suelo se encuentran la lecitina, los ácidos nucleicos y las fitinas los cuales en presencia de fuentes de carbono y nitrógeno de fácil asimilación para los microorganismos pueden ser degradados por acción de estas enzimas liberando fósforo en forma de fosfatos (Alexander, 1987).



La acción hidrolítica de las enzimas extracelulares en la matriz del suelo, permite la reducción de las macromoléculas a moléculas más pequeñas (oligómeros, monómeros, iones pequeños), que son más solubles y pueden difundir en la red de poros del suelo, las cuales son reconocidas por el sistema de permeasas y tomadas por la biota del suelo (Quiquampoix y Mousain, 2005).

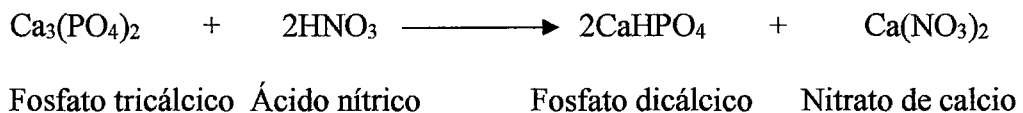
El P orgánico del suelo puede ser liberado de los compuestos orgánicos en el suelo a través de tres grupos de enzimas: a) fosfatasa no específicas (fosfomonoesterasas), las cuales efectúan la defosforilación de los enlaces fosfoéster o fosfoanhídros presentes en la materia orgánica; b) fitasas, las cuales liberan el P del ácido fítico y c) fosfonatasas y liasas C-P, enzimas que llevan a cabo el clivaje del enlace C-P presente en fosfonatos orgánicos. La principal actividad corresponde aparentemente al trabajo de las fosfatasa ácida y a las fitasas, debido a la presencia predominante en el suelo de los sustratos sobre los que actúan (Quiquampoix y Mousain, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006).

El fitato, es la fuente primaria de inositol, la principal forma de almacenamiento del P y representa alrededor del 80% del total de P en cereales y leguminosas (Xiong *et al.*, 2004). A pesar de que el ácido fítico es el mayor componente de las formas orgánicas del P en el suelo, la habilidad de las plantas para obtener el P directamente a partir del fitato es muy limitada.

Generalmente, las fitasas producidas por los hongos son extracelulares, mientras que en las bacterias comúnmente son endoenzimas. Las únicas bacterias en las cuales se ha registrado actividad fitasa extracelular pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Enterobacter*. En el caso de *Escherichia coli*, la actividad fitasa se ha detectado en el periplasma (Konietzny y Greiner, 2004). La mayoría de las fitasas tienen un pH óptimo en el rango de (4.5 - 6.0), pero las fitasas de *Bacillus* sp., tienen pH óptimos neutrales o alcalinos (Lei y Porres, 2003).

2.3.2. Solubilización de fósforo inorgánico por ácidos

Los fosfatos insolubles que no pueden ser asimilados por las plantas, pueden ser llevados a formas solubles por la acción de muchos microorganismos. La vía principal de solubilización es mediante la producción de ácidos tales como el ácido nítrico y sulfúrico.



La solubilización puede producirse por dos mecanismos diferentes: Por la acción de ácidos orgánicos producidos por microorganismos que asimilan directamente los fosfatos insolubles acumulándolos en sus células y liberándolas posteriormente. El mecanismo de solubilización en los suelos se favorece cuando estos presentan pH bajos, con un bajo contenido de calcio y alto contenido de materia orgánica (Guerrero, 1996) además depende también del contenido de fósforo presente en la solución suelo.

Los posibles mecanismos para explicar la actividad de los MSF son la acidificación por la producción de ácidos orgánicos (Cunningham y Kuiack, 1992) o la producción de protones asociada con la asimilación de amonio (Roos *et al.*, 1984). Los MSF pueden ser muy efectivos en la solubilización de fosfato de calcio (Ca) con la

producción de ácidos orgánicos (Cunningham y Kuiack, 1992; Vassilev, 1996) o sin estos (Illmer y Schinner, 1995). La actividad de los MSF usualmente se ha evaluado con diferentes fuentes de carbono como glucosa (Asea *et al.*, 1988; Kucey, 1983; Vassilev, 1996) o sacarosa (Wenzel *et al.*, 1994; Cunningham y Kuiack, 1992). Además, en la mayoría de estudios se encontró que el amonio fue la mejor fuente de N (Asea *et al.*, 1988; Wenzel *et al.*, 1994). Estas observaciones indican que la solubilización de P es un fenómeno complejo que depende de muchos factores, tales como los nutricionales, fisiológicos, y condiciones de crecimiento de los cultivos (Cunningham y Kuiack, 1992).

Existen diferentes criterios sobre los mecanismos de solubilización de P inorgánico (Illmer y Schinner, 1995). Los principales mecanismos de la solubilización de fosfatos son la excreción o producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido glucónico (Whitelaw, 1997); esto conduce a la acidificación del medio y la formación de complejos con el catión, dependiendo de la estructura del ácido orgánico. En fosfatos de Ca, Al y Fe (III) la solubilidad se incrementa por debajo de pH 5 (Stumm y Morgan, 1995).

La participación del ácido glucónico en la solubilización de fosfato de Ca se ha reportado para *Penicillium* sp. (Illmer y Schinner, 1992) y *Aspergillus niger* (Illmer y Schinner, 1995). También ha sido relacionado con la solubilización de roca fosfórica por *Penicillium variable* (Vassilev *et al.*, 1996), y liberación de Fe^{3+} , Ca^{2+} y Al^{3+} de rocas por *Penicillium frequentans* (De La Torre *et al.*, 1993). En *Penicillium radicum* se encontró que la concentración de gluconato fue más alta en el medio de cultivo que contenía fosfato de calcio.

La producción de ácidos orgánicos por los microorganismos es considerada el mecanismo fundamental de la solubilización del fosfato mineral. La oxidación periplásmica directa de glucosa a ácido glucónico, y a menudo ácido 2-cetoglucónico, conforma la base metabólica de este proceso en algunas bacterias Gram negativas (Goldstein, 1995). El incremento en la concentración de P soluble en medio líquido previamente inoculado con *Penicillium* sp. Fue relacionado con la secreción de ácidos orgánicos, los cuales pueden correlacionarse con la acidez titulable y el pH del medio (Illmer y Schinner, 1992; Narsian *et al.*, 1993; Illmer *et al.*, 1995). Se ha encontrado que la bacteria *Klebsiella oxytoca* es productora de ácido málico durante la solubilización de

la roca fosfórica, cuyos valores incrementan y disminuyen con el tiempo según las evaluaciones realizadas periódicamente (Illmer *et al.*, 1995). Se ha reportado que el ácido glucónico participa en la solubilización de fosfato de calcio por *Erwinia herbicola* (Liu *et al.*, 1992).

Los mecanismos de solubilización dependen de la producción de la biomasa microbiana que está en función de la asimilación de NH_4^+ (Jurinak *et al.*, 1986). Al analizar los resultados de biomasa de *Penicillium aurantiogriseum* y *Pseudomonas* sp., Halvorson *et al.*, (1990) proponen que la mayor efectividad en la absorción de P por los sistemas de microorganismos, es posible por la asimilación del P de la solución, lo cual hace que se altere el equilibrio entre las sales de P y el P en solución, de esta forma los fosfatos de Ca se disolverían indirectamente, mediante la continua remoción del P presente en la solución.

Illmer y Schinner (1995), señalan al ácido glucónico como el único ácido orgánico liberado por *Penicillium aurantiogriseum* y *Pseudomonas* sp. El comportamiento del ácido glucónico fue evaluado de forma abiótica en diferentes valores de pH y según los mismos autores, las diferentes concentraciones de ácido glucónico no tienen efecto en la solubilidad de fosfatos de calcio. El único factor determinante para solubilización de fosfato es la concentración de H^+ originada del HCl. Con este simple experimento se podría demostrar que la formación de complejos con el ácido glucónico no tiene ninguna responsabilidad en la solubilización de la apatita y brushita, aunque éste es el único ácido producido por los dos microorganismos solubilizadores de fosfatos. En la literatura se piensa que, citrato (Cunningham y Kuiack, 1992) oxalato (Lapeyrie *et al.*, 1991), α -ketogluconato (Kucey, 1988), lactato y succinato (Kucey, 1983), gluconato (Eckhardt, 1979) y otros ácidos (Berthelin *et al.*, 1991; Yadav y Singh, 1991) son responsables de la solubilización de fósforo.

La hipótesis de que los MSF tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos específicos y/o polisacáridos extracelulares (Kim *et al.*, 1998; Halvorson *et al.*, 1990) ha sido corroborada por clonación de la pirroloquinona sintasa PQQ (Goldstain y Liu, 1987; Rodríguez *et al.*, 2000) y genes *gabY* implicados en la producción de ácido glucónico. El ácido glucónico fue el principal ácido orgánico producido debido a la oxidación directa de glucosa por *Pseudomonas*, y está implicado en la solubilización de fosfatos (Goldstein *et al.*, 1993).

Se ha encontrado que los ácidos orgánicos forman complejos solubles con iones metálicos como el Ca^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} que están asociados al fósforo insoluble, reduciendo su adsorción y haciendo que éste quede en forma disponible (Rashid *et al.*, 2004).

En los últimos años se ha avanzado en forma considerable en la comprensión de los procesos moleculares y bioquímicos involucrados en la solubilización de P inorgánico mediada por ácidos orgánicos (Cuadro 3). En las bacterias, la reacción de oxidación de la glucosa a ácido glucónico ocurre por acción de la enzima extracelular glucosa deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.1.99.17), la cual requiere invariablemente la PQQ (pirroloquinolina quinina) como coenzima. El ácido glucónico resultante puede a su vez ser oxidado hasta 2-cetogluconato por la actividad catalítica de la ácido glucónico deshidrogenasa (GADH). El paso final de oxidación a ácido 2,5-dicetogluconico es mediado por la 2-cetogluconato deshidrogenasa (KGDH). Todas las tres enzimas están localizadas en la membrana celular y son inducidas por concentraciones de glucosa superiores a 15 mM (Ramachandran *et al.*, 2006).

Cuadro 3: Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)

Ácido	Formula	Ruta biosintética	Bacteria que lo produce	Referencia
Acético	CH ₃ CO ₂ H	Oxidación incompleta de azúcares (fermentación acética)	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Singh y Amberger (1998)
Láctico	CH ₃ CHOHCH ₂ CO ₂ H	Fermentación láctica (Glicolisis)	<i>Bacillus licheniformis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	Bano y Musarrat (2003)
Oxálico	HO ₂ CCO ₂ H	Ácidos tricarbónicos	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amberger (1998)
Cítrico	HO ₂ CCH ₂ COHCO ₂ HCHO ₂ CO ₂ H	Ácidos tricarbónicos	<i>Erwinia herbicola</i> y <i>Yarrowia lipolytica</i>	Goldstein (1995) Vassileva <i>et al.</i> (2000)
Butírico	CH ₃ (CH ₂) ₂ CO ₂ H	Oxidación anaeróbica del piruvato	<i>Bacillus licheniformis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	Wan y Wong (2004)
Succínico	HO ₂ CCH ₂ CH ₂ CO ₂ H	Ciclo del glioxilato y ácidos tricarbónicos	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. putida</i>	Liu <i>et al.</i> (1992)
Málico	HO ₂ CCHOHCH ₂ CO ₂ H	Ácidos tricarbónicos	<i>Bacillus megaterium</i>	Singh y Amberger (1998)
Glucónico	HO ₂ C(CHOH) ₄ CH ₂ OH	Oxidación directa de la glucosa	<i>Erwinia herbicola</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>	Goldstein y Liu (1987)
Fumárico	HO ₂ CCOCH ₂ CO ₂ H	Ácidos tricarbónicos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Harrison <i>et al.</i> (1972)
2 - Cetoglutárico	HO ₂ CO(CHOH) ₄ CH ₂ OH	Oxidación directa de la glucosa	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>R. meliloti</i> y <i>Bacillus firmus</i>	Anderson <i>et al.</i> (1985)

Fuente: Toro *et al.*, 1997

2.4. MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO

2.4.1. Bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos

Diversas especies bacterianas tienen capacidad para solubilizar compuestos inorgánicos de P insolubles como el fosfato tricálcico, dicálcico, hidroxapatita y en cierta medida rocas fosfóricas (Goldstein, 1986). Entre los géneros con esta capacidad destacan: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Cuadro 4).

Entre las bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP), los *Pseudomonadales fluorescentes* que colonizan agresivamente las raíces de las plantas, son consideradas como un importante grupo de bacterias debido a sus propiedades (biofertilizante y biocontrol). Aunque algunas bacterias que pertenecen a los géneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Achromobacter* y *Bacillus* se han reportado como solubilizadores de fosfato, las cepas que pertenecen a *Pseudomonas* se consideran como solubilizadoras eficientes de fosfato (Villegas y Fortin, 2001).

2.4.2. Hongos solubilizadores de fosfatos

El grupo en hongos con capacidad de solubilizar fosfato inorgánico son: solubilizadores de fosfato de calcio *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Trichoderma atroviride* y para el fosfato de hierro *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces*. Cepas específicas de los géneros *Aspergillus* (Banik y Dey, 1982; Nunes *et al.*, 2002), y *Penicillium* (Nunes *et al.*, 2002; Whitelaw *et al.*, 1999), son consideradas como las más eficientes en la solubilización de formas inorgánicas de fósforo, ya que se ha determinado que tienen mayor potencial solubilizador que otros hongos aislados del suelo.

Cuadro 4: Bacterias y hongos con capacidad de solubilizar fósforo

Bacterias	Fuente	Hongos	Fuente
<i>Pseudomonas</i> sp.	Illmer y Schinner (1995)	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Narsian y Patel (2000)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Illmer <i>et al.</i> (1995)	<i>Penicillium radicum</i>	Illmer <i>et al.</i> (1995)
<i>Erwinia herbicola</i>	Whitelaw <i>et al.</i> (1999)	<i>P. aurantiogriseum</i>	Ídem
<i>Streptomyces griseus</i>	Moura <i>et al.</i> (2001)	<i>P. simplicissimum</i>	Ídem
<i>Bacillus licheniformis</i>	Vásquez <i>et al.</i> (2000)	<i>P. rugulosum</i>	Reyes <i>et al.</i> (1999)
<i>B. atrophaeus</i>	Ídem	<i>Aspergillus niger</i>	Illmer y Schinner (1995)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Ídem	<i>Trichoderma atroviride</i>	Vera <i>et al.</i> (2002)
<i>Paenibacillus macerans</i>	Ídem	<i>Aspergillus oryzae</i>	Ídem
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Ídem	<i>Gongronella butleri</i>	Ídem
<i>Xanthobacter agilis</i>	Ídem	<i>Penicillium implicatum</i>	Useche <i>et al.</i> (2004)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ídem	<i>P. citreo-viride</i>	Ídem
<i>E. taylorae</i>	Ídem	<i>Paecilomyces</i> spp.	Ídem
<i>E. asburiae</i>	Ídem	<i>Aspergillus niger</i>	Ídem
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	Ídem	<i>A. fumigatus</i>	Ídem
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Ídem	<i>Scopulariopsis</i> sp.	Ídem
<i>P. cepacia</i>	Useche <i>et al.</i> (2004)	<i>Moniliella</i> sp.	Ídem
<i>P. gladioli</i>	Ídem	<i>Mortierella</i> sp.	Ídem
<i>Xanthomonas</i> spp.	Ídem		
<i>X. maltophilia</i>	Ídem		
<i>Chromobacterium</i> sp.	Ídem		
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Ídem		

2.5. EFECTOS PRODUCIDOS EN DIFERENTES CULTIVOS POR LA APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO

Varios estudios han demostrado que la inoculación con hongos y bacterias solubilizadoras de P pueden incrementar el rendimiento o el crecimiento de las plantas, tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo (Chuang *et al.*, 2007; Vassilev *et al.*, 2007; Valverde *et al.*, 2007; Wasule *et al.*, 2007; Widada *et al.*, 2007). Numerosos resultados demuestran con frecuencia, la combinación de microorganismos con diferentes características, tales como solubilizadores de P (MSF) combinados con diazótrofos o con hongos micorrízicos arbusculares, arrojan efectos superiores a la inoculación con únicamente el MSF (Valverde *et al.*, 2007; Babana y Antoun, 2007).

Valverde *et al.*, (2007) efectuaron varios experimentos en invernadero y campo para evaluar el efecto de la inoculación con *Pseudomonas jessenii* PS06, bacteria solubilizadora de P, y *Mesorhizobium ciceri* C-2/2, solos o en combinación, sobre el crecimiento de garbanzo. En invernadero, la inoculación con sólo C-2/2 produjo la más alta masa seca en la planta (24% mayor al testigo sin inocular) y la inoculación con PS06 resultó en una masa seca 14% mayor que el testigo no inoculado, aunque no se detectó correlación con el contenido de P en los tallos. La co-inoculación con las dos cepas produjo a su vez reducción en la masa seca del garbanzo en relación con la inoculación con únicamente C-2/2. Bajo condiciones de campo, las plantas inoculadas con C-2/2 solo o en combinación, produjeron una mayor masa fresca de los nódulos, mayor número de nódulos y más alto contenido de N. Aunque la inoculación con PS06 no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas, la co-inoculación produjo mayor rendimiento en semillas (54% mayor al testigo sin inocular) y mayor masa fresca de los nódulos. Los resultados contrastantes de la co-inoculación en invernadero y campo pudo deberse, según los autores, a diferencias en el sustrato (perlita vs. suelo) de siembra y/o a las condiciones climáticas.

Estudios registrados por Babana y Antoun (2007), demostraron que el uso simultáneo de hongos vesículo arbusculares (VAM) y diferentes MSF como inoculantes, produjo respuestas positivas en varios parámetros agronómicos evaluados

sobre plantas de trigo fertilizadas con roca fosfórica. A los 45 días de efectuada la siembra, la inoculación simultánea con hongos VAM y una cepa de *Pseudomonas* sp., promovió la mayor tasa de colonización por los hongos micorrízicos en relación con el testigo (62% vs. 5.5%). Cuando la inoculación incluyó VAM y los solubilizadores de P *Pseudomonas* sp. y *Aspergillus awamori* C1, se produjeron los mayores rendimientos de grano junto con una mayor concentración de P en los tejidos vegetales.

El rendimiento de trigo aumentó hasta un 30% con la inoculación de *Azotobacter* y hasta 43% con inoculación de *Bacillus* (Kloepper, 1989), y un aumento en el rendimiento del 10 - 20% en el mismo cultivo se informó en campo utilizando una combinación de *Bacillus megaterium* y *Azotobacter chroococcum* (Brown, 1974). Whitelaw *et al.*, (1997) observaron un aumento del 16% en el rendimiento en materia de planta de trigo y un aumento del 14% en el consumo total de la planta debido a la inoculación de *Penicillium bilaji* en un experimento de invernadero.

La aplicación de *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* junto con roca fosforica produjo incrementos en varios parámetros de crecimiento y rendimiento, en cultivos de ají y pepino, en condiciones de invernadero y campo (Supanjani *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006).

Plantas de rábano (*Raphanus sativus*, L. var. Scarlet Globe) fueron cultivadas en un suelo ferralítico e inoculadas con *Pantoea* sp. (Cepa 9C). El resultado fue la concentración foliar de P en la biomasa aérea de 3252 mg P kg⁻¹ que constituye un incremento de 60% con respecto a las plantas no inoculadas, lo cual supera lo informado por El-Komy (2005), quien detectó un incremento de 53% en plantas de trigo inoculadas con *Pseudomonas striata* y *Bacillus polymyxa*, y a lo reportado por Reyes *et al.*, (2002) en plantas de maíz inoculadas con *Penicillium rugulosum* quien detecto un incremento en el contenido de P de 38%.

Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizósfera de arroz y banano, han demostrado tener efecto positivo en la solubilización de Ca₃(PO₄)₂. El efecto de la aplicación de formulaciones inoculantes de los dos strains de *Pseudomonas fluorescens* solubilizadoras de P, fue evaluado en *Vigna mungo* a través de un ensayo de campo. La vermiculita fue utilizada como base inorgánica para desarrollar las formulaciones. La bioinoculación combinada de estos dos organismos mediante una

formulación, aumentó el rendimiento de vainas en un 300% en comparación con el control. También incrementó significativamente el peso seco de la raíz y del follaje, la longitud del tallo y número de ramas por planta (Sarma *et al.*, 2009).

La inoculación de trigo con *Azospirillum brasilense* incrementó significativamente el peso seco de la planta, el número de tallos por planta, mejoró la fertilidad y rendimiento de grano (Bashan, 1986). La coinoculación de *Azospirillum* y *Azorhizobium caulinodans* en trigo, incrementó significativamente el peso seco y el contenido de nitrógeno, en comparación con las plantas no inoculadas (Sabry *et al.*, 1997). Incluso en condiciones de estrés, la inoculación de *Azospirillum* en trigo tuvo resultados positivos en el rendimiento de grano y mejoró la nutrición mineral. La disminución del rendimiento de grano en condiciones de sequía fue de 26.5% en las plantas no inoculadas, mientras que en plantas inoculadas con *Azospirillum* fue de 14.1%. Los granos cosechados de plantas inoculadas con *Azospirillum* tuvieron un contenido más alto de Mg, K y Ca que las plantas no inoculadas (Creus *et al.*, 2004). Por lo tanto, la inoculación puede incrementar el rendimiento de grano y también la acumulación de N total en planta (Boddey y Döbereiner, 1988; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

La inoculación combinada de *Rhizobium* sp. y bacterias solubilizadoras de fosfato incrementó la nodulación, crecimiento y los parámetros de rendimiento en garbanzo (Alagawadi y Gaur, 1988; Gupta y Namdeo, 1997; Jain *et al.*, 1999; Khurana y Sharma, 2000). El efecto de la inoculación combinada de *Rhizobium* sp. y las bacterias solubilizadoras de P *Pseudomonas striata* o *Bacillus polymyxa* con y sin adición de fertilizante químico en el rendimiento y contenido de nutrientes de garbanzo fue estudiada bajo condiciones de invernadero. Mientras que la inoculación por separado de *Rhizobium* incrementó la nodulación y la actividad nitrogenasa, las solubilizadoras de fosfato aumentaron el contenido de P disponible del suelo. La inoculación combinada de *Rhizobium* sp. y *P. striata* o *B. polymyxa* no solo incrementó los parámetros anteriores sino también el contenido de materia seca, el rendimiento de grano y la absorción de N y P, en relación al control sin inocular. Los efectos de la inoculación fueron más evidentes en presencia de fertilizantes. Las posibilidades de ahorro de la mitad de la dosis de N, la sustitución del superfosfato con roca fosfórica y

la inoculación con fósforo solubilizadores merecen especial atención (Alagawadi y Gaur, 1988).

El efecto de la inoculación combinada de la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium*, la bacteria solubilizadora de fósforo *Bacillus megaterium* ssp. *phosphaticum* cepa-PB y el hongo controlador biológico *Trichoderma* spp. en el crecimiento, la absorción de nutrientes y el rendimiento de *Cicer aritenium* (garbanzo), fue estudiado bajo condiciones de invernadero y de campo. La inoculación combinada de estos tres organismos en garbanzo originó mayor germinación, absorción de nutrientes, altura de planta, número de ramas, nodulación, biomasa total y rendimiento, en comparación con cualquiera de las inoculaciones individuales o un control sin inocular. El incremento del crecimiento y los parámetros de rendimiento fueron más evidentes cuando *Trichoderma harzianum* PDBCTH10 fue inoculado con la bacteria solubilizadora de fosfatos y *Rhizobium* (Rudresh *et al.*, 2005).

El uso potencial de los MSF como alternativa a la fertilización tradicional ya ha tenido éxito comercial en varios casos. En Australia, *Penicillium bilaiae* y *Penicillium radicum* se han liberado exitosamente como inoculantes comerciales (Wakelin *et al.*, 2004) y en Canadá, *Penicillium bilaiae*, se comercializó bajo la marca JumpStart®. El producto comercial se registró para uso en trigo en 1990, año en el cual sólo se utilizó en unas pocas hectáreas. Para el 2002, aproximadamente un millón de hectáreas sembradas con los principales cultivos de Canadá utilizaban el biofertilizante (Leggett *et al.*, 2007). En Cuba, Fosforina® es un bioinoculante a base de *Pseudomonas fluorescens* aplicado principalmente en tomate. En Colombia, actualmente se comercializa Fosfosol®, cuyo ingrediente activo es *Penicillium janthinellum*. Está dirigido especialmente al cultivo del arroz, produciendo incrementos del rendimiento entre el 5 y el 38% con respecto a cultivos no inoculados (Rojas y Moreno, 2008; Moreno *et al.*, 2007).

2.6. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA INOCULACIÓN DE MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO INORGÁNICO EN CONDICIONES DE CAMPO E INVERNADERO.

En la inoculación de *Burkholderia lata* cepa 383, las semillas de ají fueron introducidas al medio de cultivo y mantenidas en agitación constante a 120 rpm por 12 horas, con el objetivo de lograr la formación de una biopelícula sobre la superficie de la semilla, con suficiente cantidad de inóculo para garantizar un nivel adecuado de colonización y alta densidad poblacional. Pasadas 12 horas de agitación, las semillas fueron sembradas directamente sobre el sustrato correspondiente. Durante la siembra fue añadido de manera individual por semilla 0.5 mL del cultivo líquido, con el fin de asegurar alta cantidad de inóculo bacteriano en los tratamientos correspondientes (Patiño, 2010).

Las esporas de *P. oxalicum* fueron mezclados con vermiculita estéril, cuya concentración fue de $4.8 - 5.4 \times 10^7$ esporas por gramo de vermiculita (Cuadro 5). Los tratamientos fueron: solo suelo; suelo + RF; suelo + *P. oxalicum* y suelo + RF + *P. oxalicum*, estos contienen 35 g de FR (20 mg de P_2O_5 kg^{-1} de suelo). En la siembra de trigo (variedad HD2733) fue incorporado 100 g de vermiculita. Dos meses después de la cosecha de trigo y sin alterar el diseño experimental fue sembrado maíz (cultivar Kanchan) y al mismo tiempo fue incorporado 25 g del inóculo microbiano con una concentración de $8.2 - 9.0 \times 10^6$ esporas (Himani y Sudhakara, 2010).

Trichoderma spp., *Rhizobium* sp. y *B. megaterium* fueron usados en un ensayo de invernadero y campo. *Rhizobium* sp. y *B. megaterium* fueron formulados con 10 g de carboximetilcelulosa por kg de material portador como adhesivo. Cuatro kilos de tierra no estéril tamizado, fueron mezclados con estiércol de corral, a razón de 10 toneladas ha^{-1} , urea a razón de 25 kg de N ha^{-1} , roca fosfórica (20% P_2O_5) a razón de 50 kg de P_2O_5 ha^{-1} , cloruro potásico a razón de 50 kg de K_2O ha^{-1} . Las semillas fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio (1%) luego tratadas con la formulación de *Trichoderma* spp. a los 3 g kg^{-1} semillas (6×10^7 UFC g^{-1}); *B. megaterium* en 5 g kg^{-1} semillas (8×10^9 UFC g^{-1}) y *Rhizobium* en 5 g kg^{-1} semillas (5×10^9 UFC g^{-1}); seis semillas de garbanzo (*Cicer aritenium* L.) fueron sembradas en cada maceta (Rudresh, 2005).

Cuadro 5: Principales métodos de aplicación de microorganismo solubilizadores de fósforo

Cultivo	Población del inóculo	Método de inoculación	Microorganismo (MSF)	Referencia
<i>Triticum vulgare</i> y <i>Zea mays</i>	4.8 - 5.4 x 10 ⁷ conidios/mL	Bioinoculante mezclado con vermiculita más semillas.	<i>Penicillium oxalicum</i>	Himani y Sudhakara (2010)
<i>Capsicum annun</i>	4 x 10 ⁷ UFC g ⁻¹	Formación de biopelícula en semillas por 12 horas	<i>Burkholderia lata</i> cepa 383	Torres (2010)
<i>Cicer arietinum</i>	8 x 10 ⁹ UFC g ⁻¹	Semillas tratadas con el bioinoculante que contiene un adherente (Carboximetilcelulosa)	<i>Bacillus megaterium</i>	Rudresh <i>et al.</i> (2004)
<i>Phaseolus mungo</i>	1 x 10 ⁸ UFC g ⁻¹	Semillas sumergidas con 10 % de goma árabiga	<i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kannapiran y Ramkumar (2011)
<i>Cicer arietinum</i>	2.5 x 10 ⁹ y 4.5 x 10 ⁹ UFC g ⁻¹	Semillas embebidas con el bioinoculante por 2 horas	<i>Pseudomonas striata</i> y <i>Bacillus polymyxa</i>	Alagawadi y Gaur (19987)
<i>Hordeum vulgare</i>	5 x 10 ⁸ UFC g ⁻¹	Semillas embebidas con el bioinoculante mas 10 % de goma árabiga	<i>Pseudomonas putida</i>	Mehrvarz y Chaichi (2008)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	1 x 10 ⁸ - 1 x 10 ⁹ UFC g ⁻¹	Raíces de plántulas sumergidas con el bioinoculante con soja triptona por 5 minutos	<i>Pseudomonas</i> sp.	Tantawy y Mohamed (2009)
<i>Rhapanus sativus</i>	1 x 10 ⁸ UFC g ⁻¹	Semillas embebidas con el bioinoculante durante 1 hora	<i>Burkholderia cepacia</i>	Lara <i>et al.</i> (2011)
<i>Solanum tuberosum</i>	1x 10 ⁷ conidios/mL	Bioinoculante es aplicado en la siembra 2L/ha	<i>Penicillium janthinellum</i>	Ñústez y Acevedo (2005)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Invernadero de Fertilidad del Suelo, de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), la cual se encuentra a 12°4'58" Latitud Sur, 76°57' Longitud Oeste y una altitud de 244 m.s.n.m.

El promedio de temperaturas máximas y mínimas anuales es 24 y 16°C respectivamente. La precipitación acumulada anual es 23 mm aproximadamente.

3.2. CULTIVOS INDICADORES

Los cultivos indicadores empleados fueron los siguientes:

Maíz PM 213 (*Zea mays*): Variedad de buenas características agronómicas, periodo vegetativo corto, recomendada para su siembra de enero a marzo y con buen comportamiento frente a factores abióticos y bióticos.

Frijol Castilla La molina (*Vigna unguiculata*): Especie de crecimiento rápido, alta producción de biomasa, adaptada a diversos tipos de suelo franco (arenoso, arcilloso o limoso). Es poco resistente a la de salinidad. Se desarrolla bien a temperaturas de 20 – 28 °C.

Trigo cultivar centenario (*Triticum vulgare*): Es una planta vigorosa que puede llegar a medir hasta 95 cm de altura; la espiga es aristada con densidad intermedia con 16 a 18 espiguillas/espiga y entre 3 a 4 granos bien formados por espiguilla. Se adapta desde los 0 hasta los 3200 msnm. Posee un potencial de rendimiento de 5.500 kg/ha en condiciones experimentales, es resistente a roya amarilla y morena.

Haba (*Vicia faba*): Es una planta con hábito de crecimiento indeterminado, con una altura intermedia que puede variar entre 75 – 90 cm, con una capacidad de producción de 2 a 3 tallos laterales.

3.3. MICROORGANISMOS EXPERIMENTALES

Los microorganismos solubilizadores de fósforo empleados en el ensayo fueron aislados y seleccionados de una colección de 50 muestras de suelos calcáreos del Valle del Mantaro y una muestra del campo “Libres” del Fundo Experimental de la UNALM de los cuales ocho suelos fueron seleccionados por su alto contenido de carbonato de calcio y bajo fósforo disponible (Anexo 20), Las muestras fueron obtenidas de los primeros 30 cm de campos agrícolas. Para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo fue empleado el medio de Pikovskaya (PVK). (Anexo 18). El medio fue preparado en líquido o solidificado mediante la adición de 15 g L⁻¹ de agar. El medio sólido fue empleado para el aislamiento, selección y caracterización de los microorganismos con capacidad solubilizadora de fosfatos. El medio líquido para evaluar la capacidad solubilizadora *in vitro* de los microorganismos caracterizados como solubilizadores de fosfatos (Alvarez, 2012).

Las bacterias y hongos fueron aislados a partir de ocho suelos, mediante la técnica de dilución en placas. El medio PKV fue suplementado con 45 mg L⁻¹ de fluconazol para el cultivo de bacterias y con 50 mg L⁻¹ de estreptomycin para el cultivo de hongos para evitar contaminación. Se trabajó con las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ para bacterias y con 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ para hongos; a partir de las cuales se realizó el conteo de colonias totales y colonias que solubilizan fósforo, y en base a esto se determinó la población (Álvarez, 2012).

Para la detección selectiva de los MSF fue empleado el medio sólido de PKV complementado con 5.0 g L⁻¹ de fosfato tricálcico grado reactivo ó 7.63 g L⁻¹ de roca fosfórica de Bayóvar, para aportar 1000 mg L⁻¹ de P inorgánico. Después de 5 días de incubación a 24 °C, fue evaluado si los microorganismos desarrollaron zonas transparentes alrededor de las colonias (halozonas). Las cepas que presentaron estas características fueron repicadas por un procedimiento de picado con punta de aguja y a los 4 días fue determinado el índice de solubilización (Álvarez, 2012).

Las mejores cepas por la mayor área de halo de solubilización y el alto índice de solubilización fueron: CBact1, CBact3 y CBact2 presentan los mejores resultados en ambas mediciones y por lo tanto constituyen las cepas más promisorias. La CFung2, fue la cepa que presentó la mayor área de solubilización. Por las razones mencionadas, se

consideró como bacterias solubilizadoras de fosfatos promisorias a las cepas CBact1, CBact2 y CBact3 aisladas de los suelos Chacrampa-3, Sincos-3 y Chacrampa-1 respectivamente y como cepa fúngica promisorias la CFung1 aislada del suelo Chacrampa-1 (Álvarez, 2012).

Las tres cepas bacterianas y una cepa fúngica seleccionadas, fueron las cepas microbianas más promisorias de acuerdo a la evaluación realizada en medio sólido. Estas fueron mantenidas en medio PVK para su caracterización e identificación taxonómica. Las cepas bacterianas fueron identificadas a nivel de género a través de pruebas bioquímicas y fisiológicas, las cuales incluyen tinción Gram, crecimiento anaeróbico, pigmentos fluorescentes en medio KB, pigmentos no fluorescentes difusibles en KB, crecimiento a 40 °C, formación de esporas y tamaño; según los procedimientos descritos por Schaad *et al.*, (2001). Las bacterias identificadas son: *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. y *Pseudomonas* sp. La cepa fúngica fue identificada por comparación de la estructura microscópica del hongo con claves de identificación taxonómica para géneros. El hongo identificado pertenece al género de *Penicillium* sp. (Álvarez, 2012).

Para determinar la disolución de fosfatos inorgánicos en medio líquido los microorganismos que desarrollaron halo en medio sólido fueron evaluados en medio líquido y posteriormente fue determinado la concentración de fósforo en forma periódica cada cinco días con lo cual se estimó cuantitativamente la solubilización del fósforo. La cantidad de fósforo soluble fue medida por el método azul de molibdeno (Cuadro 6).

3.4. SUELO

El suelo empleado para el ensayo, fue colectado de la capa arable de una parcela agrícola ubicada en el campo “Libres 1” del Fundo Experimental de la UNALM. El suelo corresponde a un *Ustic Torrifuvents* (Soil Taxonomy, 2010); y fue seleccionado por presentar un pH ligeramente alcalino (7.33), similar al que presentan los suelos de donde fueron aislados los microorganismos, para que este factor no influya en la solubilidad de los compuestos fosfatados y además por presentar un contenido medio de CaCO₃ (4.40 %) que reduce la disponibilidad de P.

Cuadro 6: Descripción del aislamiento, selección y caracterización de los microorganismos empleados en ensayo

Fase 1: Aislamiento de cepas con capacidad de solubilización de fosfato de calcio	Fase 2: Solubilización de fosfatos in vitro	Fase 3: Caracterización taxonómica de MSF a nivel de género
<p>Siete suelos del valle del Mantaro fueron seleccionados por su alto contenido de carbonato de calcio y bajo fósforo disponible. Se incluyó un suelo agrícola del campus de la UNALM</p>	<p>Las cepas que desarrollaron halo en medio sólido y que presentaron el índice más alto de solubilización y/o mayor área del halo de solubilización se evaluaron en medio líquido</p>	<p>La caracterización fue realizado a través de pruebas bioquímicas y fisiológicas</p>
<p>Medio de cultivo empleado fue Pikovskaya (PKV), con fosfato tricálcico grado reactivo $[Ca_3(PO_4)_2]$ o roca fosfórica de Bayóvar</p>	<p>Se inoculó una suspensión a una concentración de 3×10^8 validada previamente con la escala de McFarland en frascos conteniendo 150 mL de medio líquido PVK adicionado con $[Ca_3(PO_4)_2]$ y RP</p>	<p>Tinción de Gram</p> <p>Crecimiento anaeróbico</p> <p>Crecimiento a 40 °C</p>
<p>Se aislaron los microorganismos mediante el método de diluciones sucesivas (10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} para bacterias y 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} para hongos)</p>	<p>El muestreo se realizo por descarte tomando una alícuota de 3 repeticiones + blanco, se centrifugo a 5,000 rpm por 20 minutos y se filtró</p>	<p>Pigmentos no fluorescentes difusibles en medio King B</p>
<p>Se seleccionaron la cepas con capacidad de disolución de en medio solido, para ello se empleo el medio PKV, Después de 5 días de incubación a 24 °C, se evaluó si los microorganismos desarrollaron zonas transparentes alrededor de las colonias (halozonas), Las cepas que presentaron esta característica fueron repicadas por un procedimiento de picado con punta de aguja y a los 4 días se determino el índice de solubilización</p>	<p>Se determinó la concentración de P en forma periódica a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días. Azul de molibdeno</p>	<p>Las bacterias identificadas fueron: <i>Pseudomonas</i> sp, <i>Bacillus</i> sp. y <i>Clostridium</i> sp.</p> <p>El hongo identificado fue <i>Penicillum</i> sp.</p>

El suelo presenta una textura franca, reacción alcalina, es ligeramente salino, y con un contenido bajo de materia orgánica. El contenido de fósforo disponible es alto, en tanto que el potasio tiene una disponibilidad media. La capacidad de intercambio catiónico del suelo es baja, con contenido medio de calcio y magnesio cambiables, con contenido bajo de sodio cambiabile. El potasio cambiabile es elevado. Las propiedades físicas y químicas del suelo, determinadas mediante el análisis de caracterización, se muestra en el Cuadro 7.

Cuadro 7: Características físicas y químicas del suelo empleado en las macetas

Característica	Unidad	Valor	Clasificación
Arena	%	37	--
Limo	%	46	--
Arcilla	%	17	--
Clase textural	--	--	Franco
pH (H ₂ O)	--	7.33	Ligeramente alcalino
CE _(1:1)	dS m ⁻¹	2.30	Ligeramente salino
CaCO ₃	%	4.40	Medio
Materia orgánica	%	1.50	Bajo
Fósforo disponible	mg kg ⁻¹	28.6	Alto
Potasio disponible	mg kg ⁻¹	191	Medio
CIC	cmol _c kg ⁻¹	10.72	Baja
Ca ²⁺	cmol _c kg ⁻¹	8.40	Medio
Mg ²⁺	cmol _c kg ⁻¹	1.68	Medio
K ⁺	cmol _c kg ⁻¹	0.41	Alto
Na ⁺	cmol _c kg ⁻¹	0.23	Bajo
Al ³⁺ + H ⁺	cmol _c kg ⁻¹	0.00	--
PSB	%	100.0	Elevado
Fósforo total	mg kg ⁻¹	1280.00	Alto

Fuente: LASPAF-UNALM, 2012

3.5. MATERIALES

3.5.1. Fase de invernadero

- 80 macetas de plástico con capacidad de 3 kg.
- Semillas de frijol, maíz, trigo y haba.
- Agua destilada.
- Suspensión microbiana.
- Papel filtro.
- Tamiz de malla de cobre de 4 mm.
- Tijera de podar.
- Regla graduada o cinta métrica.
- Recipientes graduados de plástico.
- Balanzas mecánica y electrónica.
- Etiquetas adhesivas.
- Bolsas de papel reciclado.

3.5.2. Fase de laboratorio

- Balanza electrónica.
- Pipeta.
- Conductivímetro digital.
- Embudos.
- Tubos de ensayo.
- Espectrofotómetro óptico (marca Thermo Scientific® HeLIOS).
- Erlenmeyer.

3.6. DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

3.6.1. Cepas microbianas

Las cepas empleadas en el ensayo fueron: Tres cepas bacterianas y una cepa fúngica previamente identificadas taxonómicamente a nivel de género.

Las suspensiones de inóculo para *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. y *Pseudomonas* sp.; fueron preparadas a una concentración 3×10^8 UFC mL⁻¹ validada con la escala de McFarland. La suspensión de *Penicillium* sp., presentó 1×10^6 conidios mL⁻¹ determinada por conteo de esporas con el hemocitómetro de Neubauer según el procedimiento descrito por French y Hebert (1980).

3.6.2. Aplicación de fósforo inorgánico

Dos niveles de P inorgánico (0 y 200 mg kg⁻¹ de suelo) fueron aplicados en forma de roca fosfórica de Bayóvar (30% P₂O₅). Los tratamientos aplicados se resumen en el Cuadro 8.

Cuadro 8: Descripción de los Niveles de P y cepas microbianas empleadas en los tratamientos del ensayo

Tratamiento	Nivel de P (mg kg ⁻¹)	Cepa	Nº Repeticiones
T1		Ninguna	4
T2		<i>Pseudomonas</i> sp.	4
T3	0	<i>Bacillus</i> sp.	4
T4		<i>Clostridium</i> sp.	4
T5		<i>Penicillium</i> sp.	4
T6		Ninguna	4
T7		<i>Pseudomonas</i> sp.	4
T8	200	<i>Bacillus</i> sp.	4
T9		<i>Clostridium</i> sp.	4
T10		<i>Penicillium</i> sp.	4

3.7. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO

3.7.1. Colecta, preparación y muestreo del suelo

El suelo fue colectado del campo “Libres” del Fundo Experimental de la UNALM en el mes de febrero del 2012, previo a la colecta el suelo fue muestreado para obtener 3 muestras de 300 g de suelo de los primeros 20 cm de la capa arable los cuales fueron llevados al laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la UNALM (LASPAF-UNALM) para su respectivo análisis, el suelo fue colectado empleando palas y sacos de polipropileno, secado al aire por 5 días, tamizado en malla de 4 mm de diámetro y posteriormente fue ensacado y llevado al laboratorio.

3.7.2. Preparación de las macetas

Las 80 macetas de plástico fueron seleccionadas, lavadas y secadas al aire por 2 a 3 horas, esterilizadas con alcohol, posteriormente fue colocado papel toalla en la base de cada maceta, una vez rotuladas las macetas fueron llenadas con 3 kg del suelo experimental.

Para la segunda campaña el contenido de cada maceta fue colocado en un envase luego el suelo experimental de cada maceta fue mullido. Las macetas fueron limpiadas con una franela y desinfectadas con alcohol, posteriormente fueron llenadas con el suelo experimental.

3.7.3. Aplicación del fósforo inorgánico

La incorporación de roca fosfórica fue realizada a fines del mes de febrero. El P_2O_5 fue aplicado al suelo seco a nivel de 0 y 200 mg kg^{-1} de suelo, empleando roca fosfórica de Bayóvar como fuente (30% de P_2O_5), mezclado uniformemente con el suelo de la maceta. Los 3 kg de suelo de cada maceta fueron mezclados con 2 g de roca fosfórica.

La incorporación de fósforo inorgánico se realizó solamente para la primera campaña ya que la roca fosfórica tiene un efecto residual.

3.7.4. Inoculación de las cepas microbianas

La inoculación con la suspensión de *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp y *Penicillium* sp., se realizó durante la siembra. Cada suspensión contenida en un matraz Erlenmeyer fue agitada en un Vortex por unos minutos antes de la inoculación. Para evitar contaminación, primero se inocularon las cepas bacterianas y luego la cepa fúngica, empleando un par de guantes quirúrgicos y una pipeta esterilizada. Con la ayuda de una pipeta se colocaron 10 mL de suspensión de esporas alrededor de las semillas que previamente fueron sembradas en su respectiva maceta.

3.7.5. Siembra y desahije

La siembra se realizó en el mes de marzo del 2012, primera campaña (cultivos de maíz y frijol castilla) y el 14 de setiembre del 2012 segunda campaña (cultivos de haba y trigo). Un día antes de realizarse la siembra se extrajeron 300 – 350 g de suelo de cada maceta para colocarlo en un envase, el suelo restante de cada maceta fue humedecido hasta alcanzar capacidad de campo. Posteriormente fueron colocados 5 semillas al suelo húmedo de cada maceta, una vez que fueron sembradas las semillas de maíz, frijol castilla y haba, fueron inoculadas con la suspensión de bacterias y esporas, por último las semillas sembradas fueron cubiertas con el suelo separado un día antes de la siembra. Para el cultivo de trigo, se sembraron 15 semillas en cada maceta.

A los cinco días después de la germinación las plántulas fueron desahijadas quedando dos plántulas vigorosas por maceta, para los cultivos de maíz, frijol castilla y haba, en el cultivo de trigo quedaron 10 plantulas vigoras por maceta.

3.7.6. Fertilización y riego

La dosis de fertilización fue 200 ppm de N, 200 ppm de K₂O y 40 ppm de MgO empleando como fertilizantes nitrato de amonio, nitrato de potasio y sulfato de magnesio el procedimiento empleado se presenta a continuación.

- 117.3 g de nitrato, 66 g de sulfato de magnesio y 112 g de nitrato de amonio fueron pesados y disueltos por separado en un envase de 500 mL.
- 100 mL de cada solución fueron transferidos a 5 botellas (300 mL de fertilizante).

- En un envase de 2.5 L fue colocado la solución de la botella (300 mL) más 1700 mL de agua destilada en total el envase contiene 2 L de solución, esta solución fue usada en las fertilizaciones sucesivas.

Las aplicaciones del fertilizante fueron iniciadas 10 días después de la germinación, las aplicaciones fueron realizadas durante 5 semanas del cultivo, cada semana fue aplicado 300 mL del fertilizante preparado, 25 mL de fertilizante fue aplicado alrededor de las plantas que contiene cada maceta.

Las macetas fueron regadas convenientemente para ello los riegos fueron frecuentes con volúmenes variables de agua manteniendo al suelo a capacidad de campo. Las macetas fueron regadas durante 2 meses, tiempo en el cual fueron evaluados los cultivos de maíz, frijol castilla (primera campaña), trigo y haba (segunda campaña).

3.7.7. Cosecha

La cosecha de maíz y frijol castilla fue realizada el 2 de mayo del 2012 primera campaña, mientras que trigo y haba segunda campaña fue realizada el 3 de diciembre, a continuación se describe el procedimiento.

- La altura final de planta fue medida con una regla métrica.
- Las hojas de las plantas fueron lavadas con agua corriente usando una franela.
- Las dos plantas de cada maceta fueron cortadas desde la base con una tijera de podar, posteriormente fueron picadas y colocadas a una bolsa de papel que previamente fue rotulada.
- Las bolsas con contenido de material vegetal fueron colocadas en una estufa a 70 °C hasta obtener el peso constante para determinar el peso seco.
- Para la cosecha de trigo, la espiga fue cortada desde la base luego colocado en una bolsa de papel, posteriormente fue colocado en una estufa para ser trillado sin dificultad.

El follaje fue sometido a análisis químico para la determinación del contenido de fósforo.

3.7.8. Determinación de fósforo

La determinación de fósforo fue realizada en el laboratorio (LASPAF-UNALM) entre los meses de julio - agosto del 2012 primera campaña y diciembre del 2012 segunda campaña, a continuación se describe el procedimiento realizado.

- 0.5 g de cada muestra (tejido vegetal) fue colocada en un Erlenmeyer de 500 mL.
- 5 mL de solución nítrica - perclórica fueron añadidos a cada uno de los Erlenmeyer de 500 mL. que contienen los restos vegetales.
- Los Erlenmeyer de 500 mL. fueron colocadas sobre una plancha de calentamiento, la temperatura fue elevada hasta 175 °C y fue digerido por 90 minutos.
- El contenido de los Erlenmeyer de 500 mL que fueron digeridos son agitados para disolver las cenizas, estos fueron transferidos unas fioles de 50 mL luego fueron enrasados con agua destilada, finalmente fueron filtradas a unas botellas de polietileno.
- Del extracto de tejido vegetal fue tomada una alícuota de 1 mL luego fue colocada a un tubo de ensayo.
- 17.4 mL de agua destilada fue añadido al tubo de ensayo, luego fue añadido 0.8 mL de la solución sulfo molibdica y solución reductora al 2.5%.
- La solución contenida en el tubo de ensayo fue agitado en un vortex, luego fue reposando por 10 minutos, posteriormente fue leído la transmitancia a 650 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro óptico (Thermo Scientific® HeLIOS).
- Antes de preparar la solución con la alícuota de resto vegetales fue preparado una serie de patrones incluyendo un blanco para construir la curva. A partir de una solución patrón de 1000 mg de P/L. fue preparado soluciones de: 0, 16, 32, 48, 64 y 80 mg de P/L y posteriormente fue desarrollado la curva en forma similar a la muestra.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada cultivo se utilizó un diseño completo al azar con arreglo factorial de 2 niveles de P (0 y 200 mg kg⁻¹) y cuatro cepas. El modelo aditivo lineal fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha \beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}; \quad i = 1, 2; \quad j = 1, 2, 3, 4; \quad k = 1, 2, 3, 4$$

Donde:

Y_{ijk} = la k-ésima observación del i-ésimo tratamiento (respuesta)

μ = estima la media general

α_i = efecto que produce la i-ésimo nivel de P aplicada al suelo

β_j = efecto debido a la j-ésima cepas solubilizadoras de P inoculada al suelo

$(\alpha \beta)_{ij}$ = efecto de la interacción entre la fuente y la cepa inoculada

ε_{ijk} = efecto aleatorio de variación (error experimental)

La distribución de grados de libertad para cada fuente de variación puede apreciarse en el Cuadro 9.

Cuadro 9: Distribución de grados de libertad por fuente de variación

Fuente de variación	Grados de libertad (G.L)	
Cepa (C) Bacterias y Hongo	C - 1	4
Nivel de fósforo (P)	P - 1	1
Interacción Cepa x Nivel de P	(C - 1)(P - 1)	4
Error experimental	CP(R - 1)	30
Total	CPR - 1	39

Los datos obtenidos de los pesos fresco y seco de plantas, así como de la extracción de fósforo fueron sometidos al análisis de variancia (ANVA) con un nivel de significación de 0.05. Los promedios fueron comparados mediante la prueba de comparación de medias HSD Tukey. Para el análisis estadístico se empleó el paquete *Agricolae* del ambiente de proceso estadístico R, versión 3.0.1 (R Core Team, 2013).

IV. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS EN EL CULTIVO DE MAÍZ

El análisis de varianza demostró que las cepas microbianas aplicadas produjeron efectos significativamente diferentes, también se observó diferencias significativas para las interacciones cepa - sustrato sobre las variables de altura, peso fresco y seco analizadas, excepto para fósforo foliar extraído. Las fuentes de P utilizadas no presentaron diferencias significativas sobre las variables evaluadas, no obstante presentaron diferencias estadísticas con un valor $p = 0.06046$ (altura) y $p = 0.06273$, (peso fresco). Las medias de los tratamientos y sus diferencias estadísticas según la prueba de Tukey se presentan en el Cuadro 10.

Según la prueba de comparación de medias, la inoculación con *Clostridium* sp. y *Penicillium* sp. generaron mayores valores en tamaño de plantas; siendo estadísticamente superiores a las plantas tratadas con las demás cepas. *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. no causaron incremento en altura de planta con respecto a las plantas sin inóculo.

En peso fresco y seco (Figura 1), *Clostridium* sp. y *Penicillium* sp. estimularon mayor producción de biomasa, siendo estadísticamente superior a las plantas inoculadas con las demás cepas. El tratamiento sin inóculo presentó valores de 127.0 y 30.8 g maceta⁻¹, para los pesos fresco y seco, respectivamente.

Mayores niveles de extracción de P (Figura 2) en la biomasa aérea de maíz fueron originados por *Clostridium* sp. y *Pseudomonas* sp., con valores de 58.14 y 55.74 mg maceta⁻¹ a pesar de no mostrar diferencia significativa con respecto a las plantas sin inóculo. Mientras que *Penicillium* sp. y *Bacillus* sp. presentaron menores niveles de extracción de P.

Cuadro 10: Efecto de la inoculación de tres cepas bacterianas y una fúngica y de la aplicación de roca fosfórica sobre la altura, peso fresco, seco y la extracción de fósforo por plantas de maíz

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Peso (g maceta ⁻¹)		P extraído (mg maceta ⁻¹)
		Fresco	Seco	
Cepa				
Ninguna	90.8 ab	127.0 ab	30.8 ab	53.9 a
<i>Bacillus</i> sp.	89.4 ab	132.3 ab	30.7 ab	49.9 a
<i>Pseudomonas</i> sp.	84.9 b	108.1 b	26.5 b	50.8 a
<i>Clostridium</i> sp.	100.0 a	166.3 a	34.9 a	58.1 a
<i>Penicillium</i> sp.	99.4 a	153.9 a	36.9 a	55.7 a
Roca fosfórica				
Sin roca fosfórica	95.7 a	146.0 a	33.0 a	55.1 a
Con roca fosfórica	90.2 a	129.0 a	30.9 a	52.3 a
Cepa	**	**	**	n.s
RF	0.06.	0.06.	n.s	n.s
Cepa × RF	**	*	*	n.s
C.V. (%)	13.19	27.14	19.73	15.57

Códigos de Significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0,05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

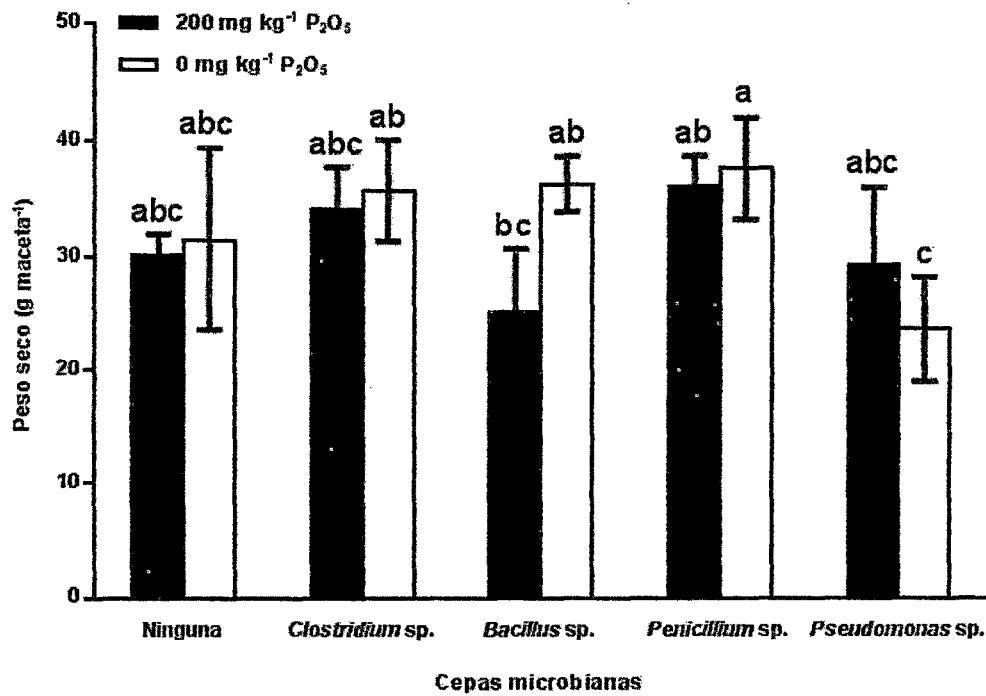


Figura 1: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fósforo y de la aplicación de fósforo sobre el peso seco por plantas de maíz

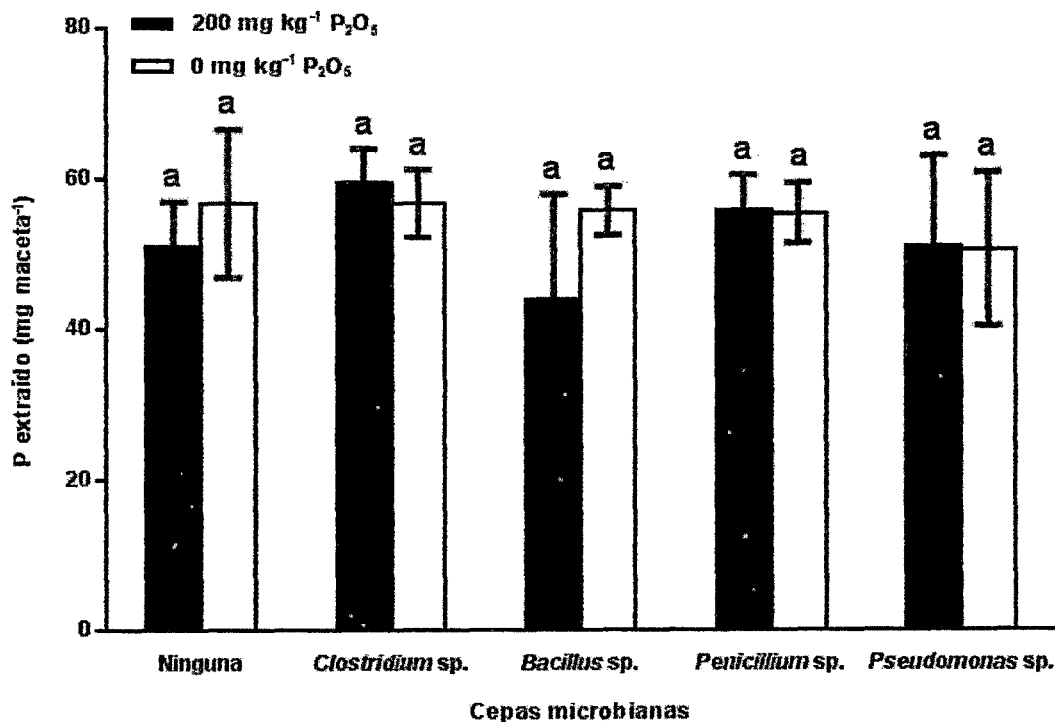


Figura 2: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fósforo y de la aplicación de fósforo sobre la extracción de fósforo por plantas de maíz

En la fuente de P utilizado no se observó diferencias significativas (Cuadro 10), sin embargo el mayor efecto en las diferentes variables se logró con los tratamientos en los cuales no se incorporó roca fosfórica al suelo, cabe mencionar que la aplicación de *Clostridium* sp. y *Penicillium* sp., permitió obtener resultados favorables para altura de planta, peso fresco y seco.

4.2. RESULTADOS EN EL CULTIVO DE FRIJOL CASTILLA

El análisis de varianza demostró que las cepas microbianas aplicadas no produjeron efectos significativamente diferentes, también se observó que no presentan diferencias significativas para las interacciones cepa - sustrato sobre las variables de altura de planta, peso fresco, seco y fósforo foliar extraído. Las fuentes de P utilizadas no presentaron diferencias significativas sobre las variables evaluadas. Las medias de los tratamientos y sus diferencias estadísticas según la prueba de Tukey se presentan en el Cuadro 11.

Según la prueba de comparación de medias, ninguna de las cepas inoculadas estimularon valores estadísticamente superiores a los tratamientos sin inoculo, sin embargo *Bacillus* sp., generó mayor tamaño de plantas en frijol Castilla y fue el único que mostro diferencia con respecto a *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., y *Clostridium* sp que presentaron los menores valores con respecto a las plantas sin inoculo.

Con respecto al peso fresco se observó que *Bacillus* sp., estimuló mayor producción respecto a *Pseudomonas* sp., *Penicillium* sp. y *Clostridium* sp, a pesar de no presentar un valor estadísticamente superior con respecto a las plantas sin inoculo. Para peso seco (Figura 3) los inóculos de *Bacillus* sp y *Clostridium* sp generaron 14.58 y 13.64 g maceta⁻¹ respectivamente, son valores superiores con respecto a *Pseudomonas* sp y *Penicillium* sp. a pesar de no presentar diferencia estadística con respecto a las plantas sin inoculo. La cepa del hongo presento el menor valor 12.14 g maceta⁻¹.

Mayores niveles de extracción de P (Figura 4) en la biomasa aérea de frijol castilla fueron originados por *Clostridium*. sp. y *Pseudomonas* sp. con valores de 36.61 mg maceta⁻¹ y 36.01 mg maceta⁻¹ pero no presentan valores significativamente diferentes con respecto a las plantas sin inoculo. *Penicillium* sp. y *Bacillus* sp. presentaron los menores niveles de extracción.

Cuadro 11: Efecto de la inoculación de tres cepas bacterianas y una fúngica y de la aplicación de roca fosfórica sobre la altura, peso fresco, seco y la extracción de fósforo por plantas de frijol Castilla

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Peso (g maceta ⁻¹)		P extraído (mg maceta ⁻¹)
		Fresco	Seco	
Cepa				
Ninguna	20.0 a	41.2 a	13.6 a	35.3 a
<i>Bacillus</i> sp.	20.8 a	45.9 a	14.6 a	36.0 a
<i>Pseudomonas</i> sp.	19.8 a	39.8 a	13.3 a	34.7 a
<i>Clostridium</i> sp.	19.9 a	40.4 a	13.6 a	36.6 a
<i>Penicillium</i> sp.	18.6 a	36.0 a	12.1 a	34.0 a
Roca fosfórica				
Sin roca fosfórica	20.3 a	42.9 a	13.8 a	34.9 a
Con roca fosfórica	19.4 a	39.1 a	13.2 a	35.5 a
Cepa	n.s	n.s	n.s	n.s
RF	n.s	n.s	n.s	n.s
Cepa × RF	n.s	n.s	n.s	n.s
C.V. (%)	9.64	22.39	13.93	9.93

Códigos de Significancia: 0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

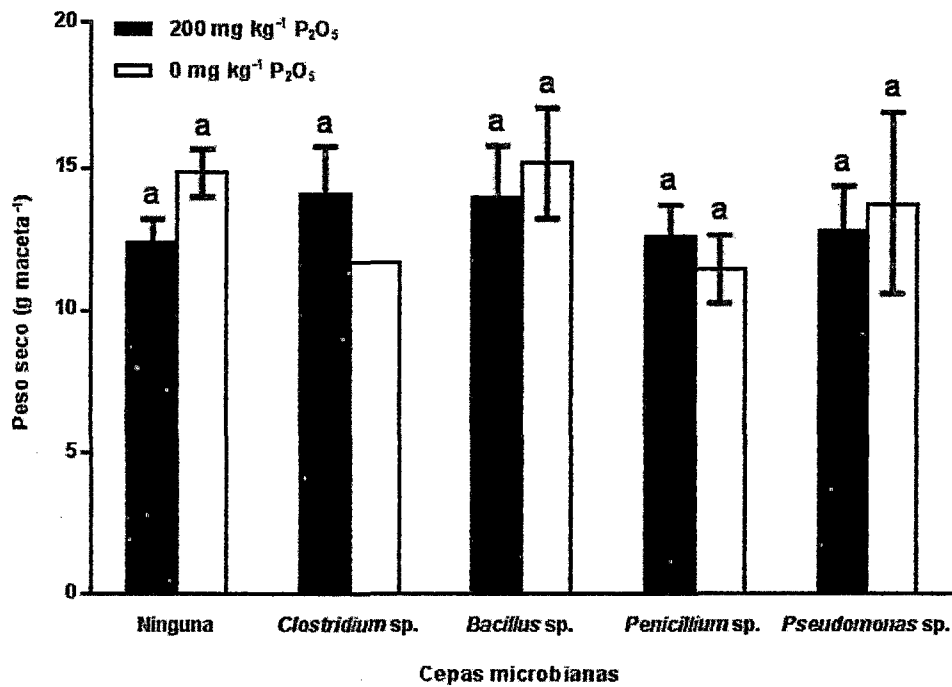


Figura 3: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre el peso seco por plantas de frijol Castilla.

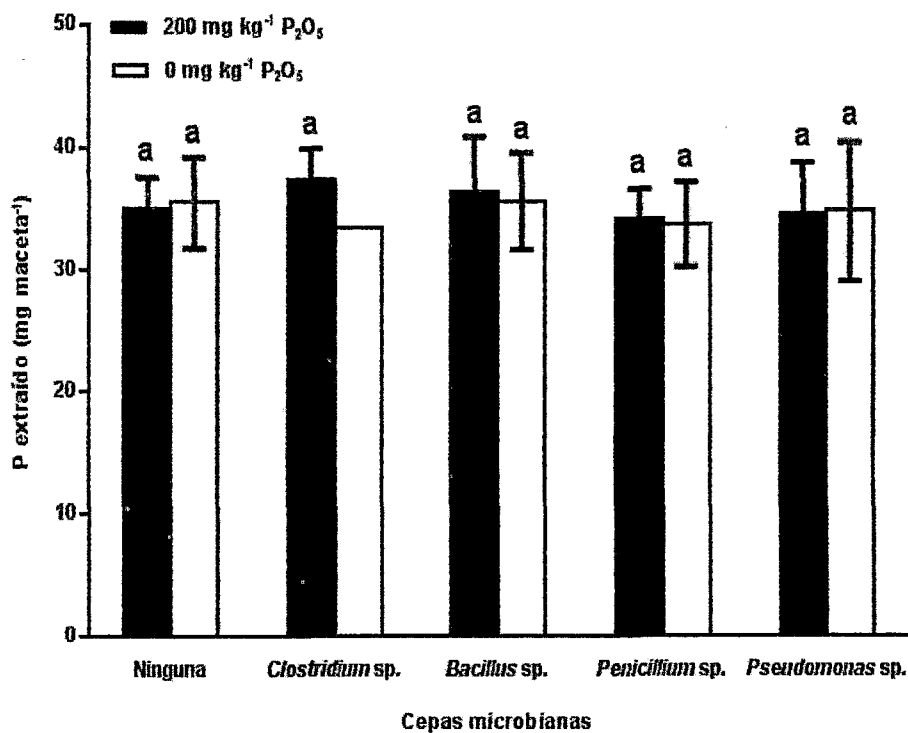


Figura 4: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre la extracción de fósforo por plantas de frijol Castilla.

4.3. RESULTADOS EN EL CULTIVO DE HABA

El análisis de varianza demostró que las cepas microbianas aplicadas no produjeron efectos significativamente diferentes, también se observó que no presentan diferencias significativas para las interacciones cepa - sustrato sobre las variables de biomasa fresca y seca, excepto para la altura de planta y el fósforo foliar extraído que presenta un $p = 0.0238 *$ y $p = 0.088$. Las fuentes de P utilizadas no presentaron diferencias significativas sobre las variables evaluadas excepto para altura de planta que presenta un valor de $p = 0.0406 *$. Las medias de los tratamientos y sus diferencias estadísticas según la prueba de Tukey se presentan en el Cuadro 12.

Según la prueba de comparación de medias, ninguna de las plantas de haba que fueron inoculadas con las cepas estimularon valores estadísticamente superiores con respecto al tratamiento sin inóculo; sin embargo hay una ligera diferencia entre ellas como se puede observar en el Cuadro 12 para la altura de planta *Penicillium* sp. y *Clostridium* sp. presentaron valores superiores con respecto a *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. El tratamiento sin ningún inóculo presentó el menor valor 63.42 cm.

En peso fresco los mejores resultados fueron obtenidos con la inoculación de *Bacillus* sp. y *Clostridium* sp. 238.4 y 231.5 g maceta⁻¹ con respecto a las demás cepas, el menor valor lo generó la cepa del hongo 218.8 g maceta⁻¹. La cepa que incremento el peso seco (Figura 5) fue *Bacillus* sp. Además se puede observar que el testigo generó mayor producción de peso seco con respecto a las demás cepas incluido *Bacillus* sp. a pesar de que el testigo presentó el menor valor en la producción de peso fresco en comparación con *Bacillus* sp., mientras que el hongo sigue generando el menor valor. A pesar de que ninguna cepa mostro valores estadísticamente diferentes con respecto al testigo.

Cuadro 12: Efecto de la inoculación de tres cepas bacterianas y una fúngica y de la aplicación de roca fosfórica sobre la altura, peso fresco, seco y la extracción de fósforo por plantas de haba.

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Peso (g maceta ⁻¹)		P extraído (mg maceta ⁻¹)
		Fresco	Seco	
Cepa				
Ninguna	63.4 a	230.3 a	37.0 a	218.6 a
<i>Bacillus</i> sp.	66.3 a	238.4 a	35.8 a	199.7 a
<i>Pseudomonas</i> sp.	66.8 a	228.5 a	33.9 a	210.2 a
<i>Clostridium</i> sp.	68.7 a	231.5 a	34.5 a	182.3 a
<i>Penicillium</i> sp.	68.7 a	218.8 a	32.6 a	159.8 a
Roca fosfórica				
Sin roca fosfórica	64.7 b	225.6 a	35.6 a	196.6 a
Con roca fosfórica	68.9 a	233.4 a	33.9 a	191.5 a
Cepa	n.s	n.s	n.s	n.s
RF	*	n.s	n.s	n.s
Cepa × RF	*	n.s	n.s	0.01.
C.V. (%)	10.74	10.40	12.17	28.21

Códigos de Significancia: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey

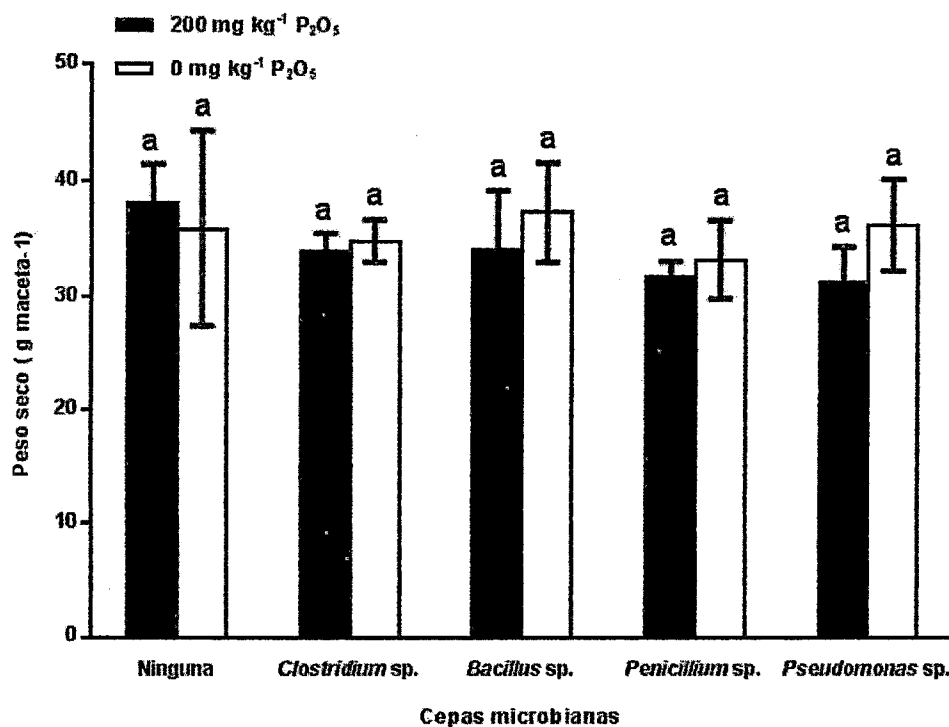


Figura 5: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fósforo y de la aplicación de fósforo sobre el peso seco por plantas de haba

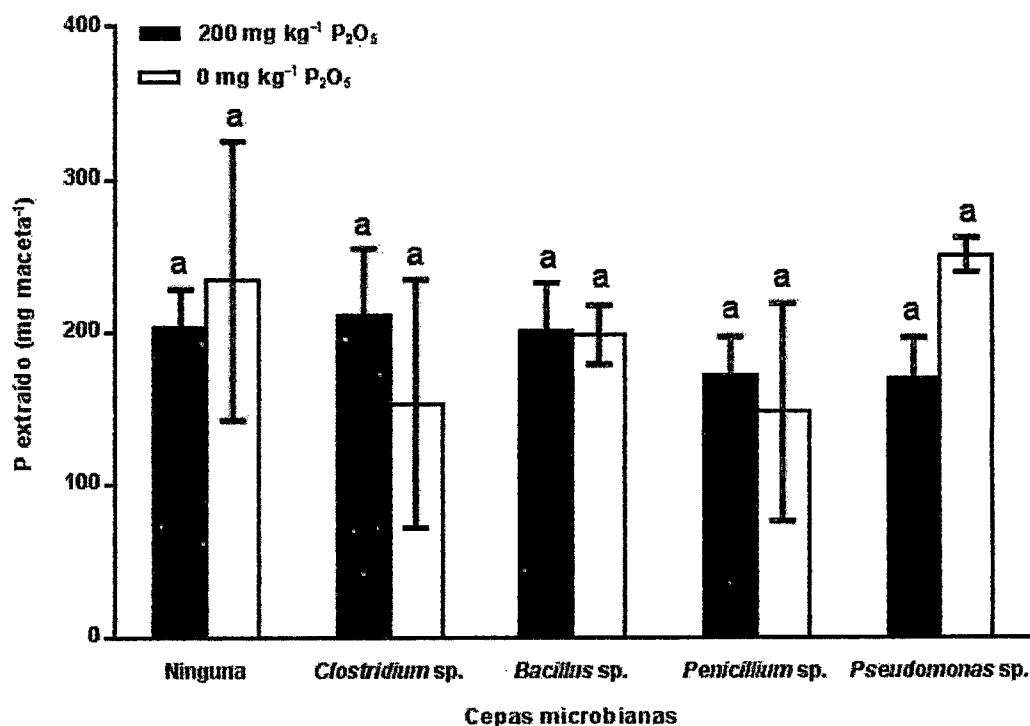


Figura 6: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fósforo y de la aplicación de fósforo sobre la extracción de fósforo por plantas de haba

Los mayores niveles de extracción de P (Figura 6) en biomasa aérea del haba fueron originados por *Pseudomonas* sp. con un valor de 210.2 mg maceta⁻¹ con respecto a las demás cepas. Sin embargo el tratamiento sin inocular generó un mayor nivel de extracción de P 218.6 mg maceta⁻¹, el menor valor 159.8 mg maceta⁻¹ fue obtenido con la inoculación de *Penicillium* sp.

La incorporación de roca fosfórica produce efectos significativos sobre la altura de planta (Cuadro 12), pero para el resto de variables evaluadas la incorporación de RF no generó diferencias significativas.

4.4. RESULTADOS EN EL CULTIVO DE TRIGO

El análisis de varianza demostró que las cepas microbianas aplicadas produjeron efectos altamente significativos, también se observan diferencias significativas para las interacciones cepa - sustrato sobre las variables de altura, peso fresco y seco analizadas, excepto para fósforo foliar extraído. Las fuentes de P utilizadas presentaron diferencias significativas sobre las variables evaluadas excepto para la variable fósforo foliar extraído. Las medias de los tratamientos y sus diferencias estadísticas según la prueba de Tukey se presentan en el Cuadro 13.

Según la prueba de comparación de medias, *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. estimularon mayores valores en tamaño de planta; siendo estadísticamente superior a las plantas tratadas con las demás cepas. *Penicillium* sp. y *Clostridium* sp. no causaron incremento en la altura de planta que sea estadísticamente superior a las plantas sin inocular, *Clostridium* sp. presentó un valor inferior al tratamiento testigo.

En peso fresco *Bacillus* ps. y *Pseudomonas* sp. incrementaron la mayor producción siendo estadísticamente superior a las demás cepas, sin embargo la inoculación con *Clostridium* sp. generó menor producción de biomasa fresca con respecto al testigo.

Cuadro 13: Efecto de la inoculación de tres cepas bacterianas y una fúngica y de la aplicación de roca fosfórica sobre la altura, peso fresco, seco, peso de granos y la extracción de fósforo por plantas de trigo.

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Peso (g maceta ⁻¹)		P extraído (mg maceta ⁻¹)	Peso de granos (g maceta ⁻¹)
		Fresco	Seco		
Cepa					
Ninguna	82.1 b	166.8 c	24.7 ab	43.5 a	15.6 a
<i>Bacillus</i> sp.	85.6 a	173.8 ab	26.3 a	38.3 ab	16.6 a
<i>Pseudomonas</i> sp.	85.7 a	173.9 a	24.9 ab	39.5 ab	16.0 a
<i>Clostridium</i> sp.	74.9 c	152.3 d	17.7 c	31.9 b	10.1 b
<i>Penicillium</i> sp.	82.6 ab	168.0 bc	22.2 b	41.9 a	12.5 b
Roca fosfórica					
Sin roca fosfórica	80.8 b	164.1 b	21.2 b	40.1 a	12.8 b
Con roca fosfórica	83.6 a	169.8 a	25.1 a	37.9 a	15.5 a
Cepa	***	***	***	*	***
RF	***	***	***	n.s	***
Cepa × RF	***	***	***	n.s	***
C.V. (%)	5.47	10.93	3.96	5.71	2.78

Códigos de Significancia: 0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

En peso seco la cepa que estimulo una mayor producción y siendo estadísticamente superior al resto de cepas fue *Bacillus* sp. (Figura 7), mientras que *Clostridium* sp. y *Penicillium* sp. presentaron los menores valores con respecto al tratamiento testigo.

Los mayores niveles de extracción de P en la biomasa aérea de trigo fueron originados por *Penicillium* sp. y testigo estos presentaron valores que son estadísticamente superiores con respecto a las demás cepas, a pesar de que *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. presentaron valores superiores en producción de peso fresco y seco (Figura 8).

Con respecto al peso seco de granos *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. y testigo 16.59 , 15.99 y 15.57 g estimularon valores estadísticamente superiores con respecto a las demás cepas. Lo cual está relacionado con la producción de peso seco ya que *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. presentaron los mayores valores (Figura 9).

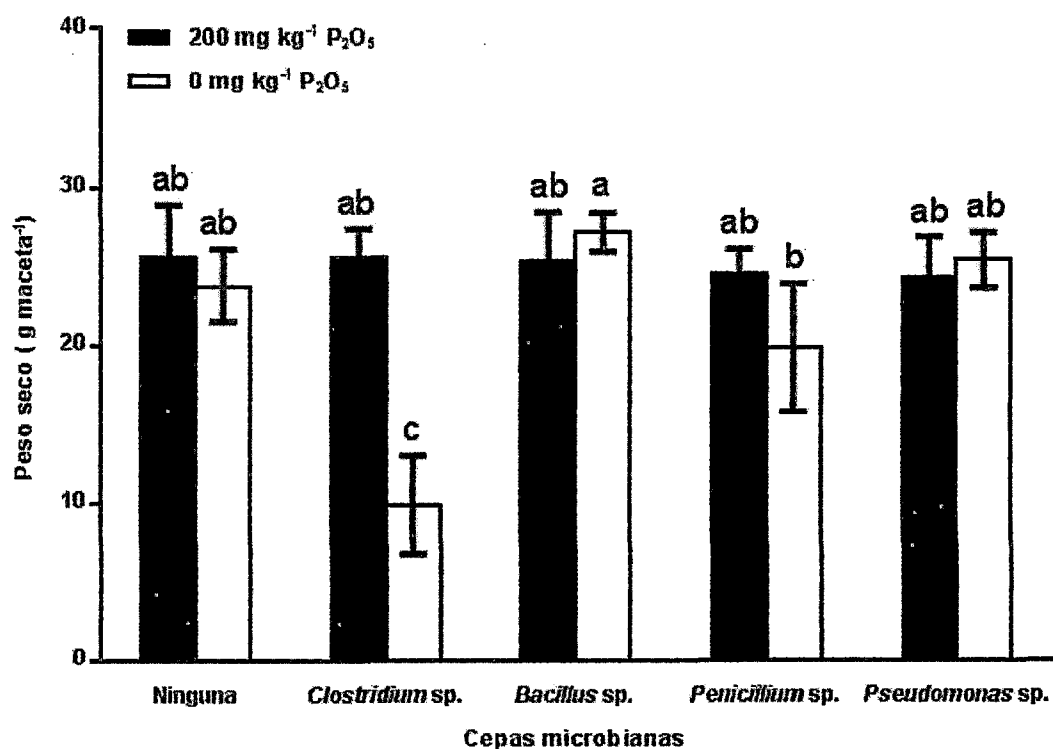


Figura 7: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre el peso seco por plantas de trigo

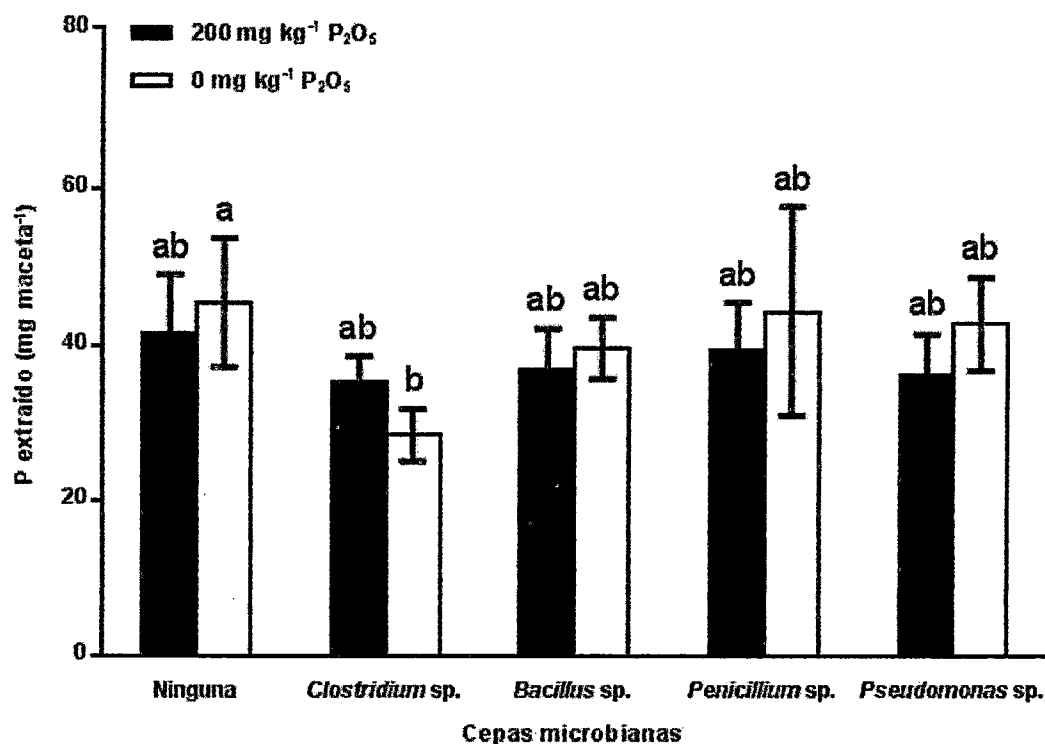


Figura 8: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre la extracción de fósforo por plantas de trigo

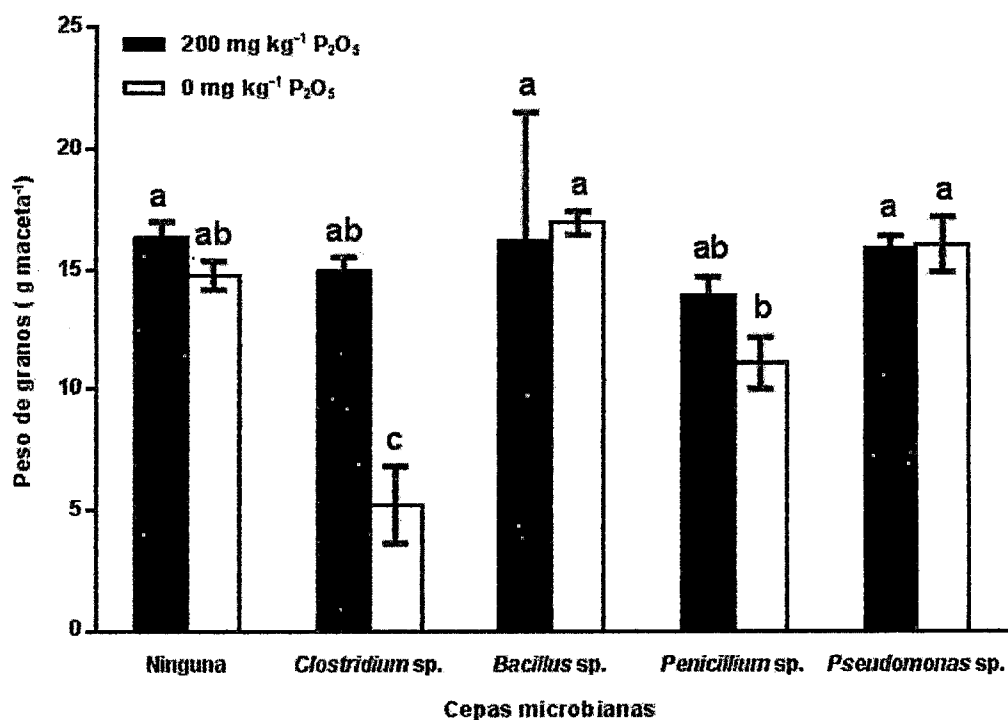


Figura 9: Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato y de la aplicación de fósforo sobre el peso de granos por plantas de trigo

V. DISCUSIÓN

En la presente investigación, la inoculación con MSF (Microorganismo solubilizadores de Fósforo) produjo efectos significativos solo en las gramíneas (maíz y trigo), para algunas variables biométricas evaluadas como altura de planta, peso fresco y seco. El fósforo extraído por la parte aérea, sin embargo no fue afectado por la inoculación con los microorganismos ensayados. En la prueba de solubilización in vitro en medio líquido realizado por Álvarez (2012), todas las cepas ensayadas (*Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp. *Penicillium* sp.), produjeron efectos altamente significativos, en ella fue determinada la relación entre la acidez titulable, pH, y el P solubilizado adicionando RF y FTC. *Clostridium* sp. y *Penicillium* sp., fueron los que estimularon mayor producción de biomasa aérea lo cual coincide con lo encontrado por Álvarez (2012), donde *Clostridium* sp. y *Penicillium* sp., mostraron mayor capacidad para solubilizar P, ya que presentaron un pH bajo y alta producción de acidez titulable (Cuadro 14), sin embargo a nivel de invernadero *Clostridium* sp. y *Penicillium* sp no tuvieron el mismo comportamiento ya que el análisis de P foliar extraído no muestra valores significativamente diferentes con respecto al testigo. El incremento de la biomasa de las plantas por lo tanto, puede ser explicado por otros mecanismos, tales como la producción de enzimas y hormonas que promueven el crecimiento, la acidificación de la rizósfera, etc.

A diferencia de lo observado para las gramíneas, la inoculación de MSF no produjo efectos significativos sobre la biomasa aérea y fósforo foliar extraído por las leguminosas (haba y frijol castilla). Los posibles factores que han influenciado en el desempeño de las cepas en estudio pueden ser: nutricional, población del inóculo, pH del suelo, método de inoculación, especificidad de microorganismo con la rizósfera del cultivo y condiciones del suelo. Lo anteriormente mencionado concuerda con los estudios realizados (Marschner, 2007; Sharan *et al.*, 2008; Trivedi y Sa, 2008).

En el ensayo, la población presente en los inóculos fue de 3×10^8 UFC mL⁻¹ para las cepas bacterianas y de 1×10^6 conidios mL⁻¹ para *Penicillium* sp. En la inoculación combinada de *Rhizobium*, *Bacillus megaterium* subsp. *phosphaticum* cepa-PB y *Trichoderma* spp realizado por Rudresh *et al.*, (2005) la población inoculada de *Bacillus megaterium* fue de 8×10^9 UFC g⁻¹ de suelo y en el ensayo de *P. oxalicum*

realizada por Himani y Sudhakara (2010), la población utilizada fue de $4.8 - 5.4 \times 10^7$ esporas por gramo de vermiculita a nivel de invernadero ver Cuadro 5 . Estos valores son muy superiores a los empleados en la presente investigación, lo cual parece indicar que la baja respuesta obtenida a la inoculación con MSF podría relacionarse con una baja población en el inoculo inicial.

Lo mencionado anteriormente coincide con lo encontrado por Rodriguez y Fraga (1999), muchas bacterias solubilizadoras de fósforo que forman parte del suelo, no se encuentran en poblaciones suficientes para competir con las bacterias que ya están establecidas en diferentes partes de la rizósfera. Por esta razón, es indispensable inocular con un mayor grado de concentración, para que puedan realizar una eficiente y alta solubilización del fósforo. En la presente investigación no se esterilizó el suelo quiere decir que las bacterias aisladas a nivel *in vitro* no tuvieron la capacidad de competir con las bacterias ya establecidas en el suelo ello podría explicar la baja respuesta de los MSF en estudio.

En los ensayos realizados por Rudresh *et al.*, (2005) y Himani y Sudhakara (2010), fuentes de materia orgánica fueron aplicadas al suelo. Estas fuentes crean condiciones favorables en el suelo para los microorganismos inoculados, de forma que los MSF pueden colonizar el suelo con mayor éxito, ya que tienen nutrientes necesarios como por ejemplo azúcares para generar ácidos orgánicos, siendo este el principal mecanismo por el cual los microorganismos liberan P al medio de la solución suelo. Esta observación indica que la solubilización de P es muy compleja y depende de muchos factores como por ejemplo, el nutricional mencionado por Cunningham y Kuiack (1992), en la presente investigación no se empleo ninguna fuente de azúcar disponible en el suelo, lo cual podría estar relacionado con la baja respuesta ante la inoculación de MSF.

En los trabajos realizados por Alagawadi y Gaur (1987), las semillas de garbanzo fueron embebidas durante 2 horas con soluciones de *Pseudomonas striata* y *Bacillus polymyxa* (2.5×10^9 y 4.5×10^9 UFC g^{-1} respectivamente), mientras que Mehrvarz y Chaichi (2008), dejan embebidas las semillas de cebada con *Pseudomonas putida* (5×10^8 UFC g^{-1}) más 10% de jarabe de goma antes de realizarse la siembra. Benites (2013), utiliza la técnica de mezclar las semillas con un adherente (Cuadro 5) para luego mezclarlos homogéneamente con el inoculo, con el fin de garantizar una alta

población de MSF sobre la superficie de la semilla. En el ensayo la inoculación de MSF fue de forma directa ya que se colocó la suspensión al suelo húmedo, ello podría explicar la baja respuesta ante la inoculación de MSF.

Con respecto a la extracción de fósforo a nivel de invernadero, las cepas en estudio no produjeron efectos significativos, con respecto al testigo, sin embargo a nivel de laboratorio las cepas obtuvieron diferencias altamente significativas. Una de las razones por la cual se genera esta diferencia puede ser por las condiciones ideales que se maneja a nivel de laboratorio como: temperatura, nutrición y provisión de azúcares (para la síntesis de ácidos orgánicos). Mientras que en condiciones a nivel de invernadero los azucares no se encuentran en forma de glucosa, el pH y la temperatura del suelo experimental son cambiantes, entonces las cepas inoculadas al suelo experimental no llegaron a colonizar con éxito por las condiciones adversas que se presentaron. Sharan *et al.*, 2008; Trivedi y Sa (2008), han reportado las mismas razones por las cuales no se lleva cabo la solubilización de fosfatos, de manera eficiente a nivel de invernadero.

En los ensayos de laboratorio el medio de cultivo líquido realizado por Álvarez (2012), se encontró una mayor solubilización de fósforo cuando se empleó fosfato tricálcico (Cuadro 14) (FTC) $K_{ps} = 2.0 \times 10^{-25}$ como fuente de fósforo, que cuando se empleó roca fosfórica (RF) de Bayóvar (Figura 10), Esto debido a que la roca fosfórica tiene $K_{ps} = 2.0 \times 10^{-30}$ y al tener la constante de producto de solubilidad alta con respecto a FTC, es difícil que se solubilice por lo tanto la cantidad de P liberado en el medio es escasa ello coincide con lo encontrado por Illmer y Schinner (1995), y Cordero *et al.*, (2008). Esto quiere decir que la capacidad solubilizadora de fosfatos es dependiente del K_{ps} . Además la solubilización superior de FTC se puede atribuir a su naturaleza amorfa, estructura simple y a la ausencia de cualquier carbonato libre en comparación con la estructura cristalina y compleja de la RF.

Cuadro 14: Solubilización de fosfato tricálcico y roca fosfórica en medio líquido por las cepas microbianas

Cepa	Fuente de fósforo					
	Fosfato tricálcico			Roca fosfórica		
	pH final	Acidez titulable meq L ⁻¹	P mg L ⁻¹	pH final	Acidez titulable meq L ⁻¹	P mg L ⁻¹
<i>Clostridium</i> sp.	4.11	31.69	429.11	4.32	11.76	58.90
<i>Bacillus</i> sp.	4.38	28.42	304.42	4.18	12.41	99.34
<i>Pseudomonas</i> sp.	4.47	11.43	151.40	3.72	13.72	115.73
<i>Penicillium</i> sp.	4.87	12.09	101.91	4.01	9.47	56.94

Fuente: Álvarez, 2012

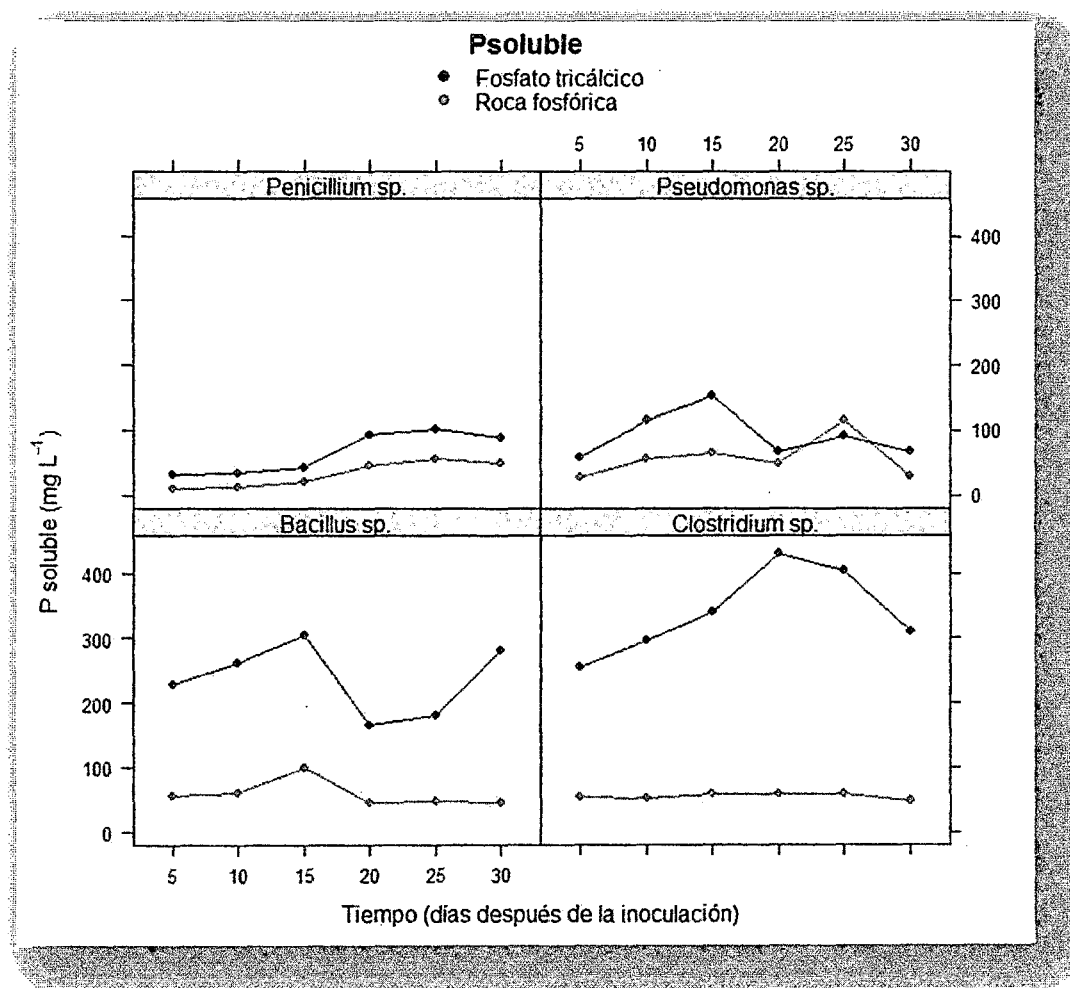


Figura 10: Variación de la concentración de P soluble en medio nutritivo adicionado con fosfato tricálcico y roca fosfórica (Álvarez 2012)

VI. CONCLUSIONES

- La inoculación con *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Clostridium* sp. y *Penicillium* sp. incrementó la producción de biomasa aérea en los cultivos de maíz y trigo, sin embargo no tuvo el mismo efecto sobre la biomasa en frijol castilla y haba cultivadas en un suelo calcáreo.
- Ninguno de los MSF inoculados afectó la extracción de P en los cultivos ensayados.
- Ninguno de los MSF inoculados mostró potencial para solubilizar el P aplicado en forma de roca fosfórica de Bayóvar.
- A pesar de los resultados hallados en experimentos de laboratorio, bajo condiciones de invernadero, la eficiencia de solubilización de fósforo fue muy baja.
- El uso de microorganismos con potencial de solubilización de fosfatos es factible para la provisión de fósforo en cultivos anuales, pero para que ello ocurra se le tienen que dar las condiciones adecuadas como inocular con una población mayor a la que se usó en el ensayo, además se debe usar un tipo de adherente, así como también añadir materia orgánica al suelo o carbohidratos para la alimentación de los microorganismos.

VII. RECOMENDACIONES

- Los microorganismos deben ser embebidos con la semilla un día antes de la siembra, para que estos queden impregnados en la superficie de las semillas.
- Seguir realizando ensayos con diferentes niveles de población, para determinar el nivel de población ideal o el más adecuado para poder ser usado a nivel de campo.
- Se deben hacer aplicaciones de fuentes de materia orgánica al suelo experimental, ya que los MSF necesitan azúcares para poder solubilizar fósforo.
- Se debe seguir realizando estudios acerca de las cepas que se usaron en este ensayo, para poder determinar las condiciones que necesitan estos MSF, y puedan solubilizar roca fosfórica.
- Realizar ensayos con suelos que tengan baja disponibilidad de fósforo y alto porcentaje de carbonatos de calcio.
- Usar acidificantes para ayudar a los microorganismos a solubilizar fosfatos de calcio que tienen alta constante de producto de solubilidad (K_{ps}).
- Realizar ensayos con micorrizas y bacterias que fijan nitrógeno para ver la interacción con los microorganismos que solubilizan fósforo.
- A nivel de laboratorio la fuente que se debe emplear para determinar microorganismos con la capacidad de solubilizar fosfatos debe de ser roca fosfórica. Los estudios de solubilización de fosfatos deben ser minuciosos, requiriéndose el empleo de medios de cultivo adecuados para detectar de manera rápida el mayor número de cepas capaces de solubilizar en medio líquido.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abd-Alla, M.H. 1994. Phosphates and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Letters of Applied Microbiology* 18: 294-296.
- Alagawadi, A.R.; Gaur, A.C. 1988. Associative effect of *Rhizobium* and phosphate-solubilizing bacteria on the yield and nutrient uptake of chickpea. *Plant and Soil* 105:241-246.
- Alexander, M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. pp: 355-371. En: *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT editor, México, 491 p.
- Alexander, M. 1987. *Introduction of soil microbiology*. New York. Ed. Wiley and Sons P 83 – 88.
- Álvarez F, P. 2012. Evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos de calcio en suelos calcáreos del Perú. Tesis MSc. Especialidad de Suelos. EPG- Universidad Nacional Agraria la Molina.
- Asea, P.; Kucey, R.; Stewart, J. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry* 20:459-464.
- Arzuaga, S.; Fernández, C.; Dalurzo, H.; Vásquez, S. 2005. Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa acida en Entisoles, Alfisoles y Vertisoles de Corrientes con diferentes usos agrícolas. *Comunicaciones científicas y tecnológicas*. Resumen A – 066.
- Banik, S.; Dey, B. 1983. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. *Plant and Soil* 69: 353-364.

- Babana, A.; Antoun, H. 2007. Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. En: Velázquez, E and Rodríguez-Barrueco, C (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer 51-58 pp.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* 16: 729-770.
- Bashan, Y.; Levanony, H. 1991. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil* 137:99-103.
- Begonia, M.; Begonia, G.; Gilliard, D.; Young, C. 2004. Phosphatase activity and populations of microorganisms from cadmium- and lead-contaminated soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 73:1035-1033.
- Berthelin, J.; Leyval, C.; Laheurte, F.; De Giudici, P. 1991. Involvement of roots, rhizosphere microflora in the chemical weathering of soil minerals. En Atkinson, D. (ed.) *Plant Root Growth: an ecological perspective*. Oxford, GB, Blackwell Scientific Publications p. 187-200.
- Beever, R.; Burns, D. 1980. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. *Advances in Botanical Research* 8:121-219.
- Benites, N. 2013. Inoculación con *Paenibacillus polymyxa* y fertilización nitrogenada en maíz bajo condiciones de temporal. Tesis de Maestra en Ciencias de Edafología. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Montecillo – México
- Boddey, R.; Döbereiner, J. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil* 108:53-65.
- Burbano, H. 1989. El Suelo: una visión sobre sus componentes bioorgánicos. Universidad de Nariño. Pasto, Colombia. 421 p.
- Brown, M.E. 1974. Seed and root bacterization. *Annual Review of Phytopathology* 12:181-97.

- Broadbent, P.; Baker, K.; Franks, N.; Holland, J. 1977. Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in nontreated soil. *Phytopathology* 67:1027-1034.
- Capper, A.; Campbell, R. 1986. The effect of artificially inoculated antagonistic bacteria on the prevalence of take-all disease of wheat in field experiment. *Journal Applied Bacteriology*. 60:155–60.
- Cordell, D.; Drangert, J.; White, S. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19:292-305.
- Cunningham, J.; Kuiack, C. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilajii*. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1451-1458.
- Chen, Y.; Rekha, P.; Arun, A.; Shen, F.; Lai, W.; Young, C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.
- Chuang, C.; Kuo, Y.; Chao, C.; Chao, W. 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils* 43:575–584.
- Cramer, M.D. 2010. Phosphate as a limiting resource: Introduction. *Plant and Soil* 334:1-10.
- Creus, C.; Sueldo, R.; Barassi, C. 2004. Water relations and yield in *Azospirillum* inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany* 82:273-281.
- Dakora, F.; Phillips, A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low – nutrient environments. *Plant and Soil* 245:25-47
- Dighton, J.; Boddy, L. 1989. Role of fungi in nitrogen, phosphorus and sulphur cycling in temperate forest ecosystems. En: Boddy, L.; Marchant, R.; Read, D. (eds.) Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi. Cambridge, GB, Cambridge University Press. p. 269-298.

- Domínguez, V.A. 1997. Tratado de fertilización 3ra. Edición. Mundi-Prensa. Madrid p.613.
- Eckhart, F. 1979. Über die Einwirkung heterotropher Mikroorganismen auf die Zersetzung silikatischer Minerale. *Pflanzenernährung and Bodenkunde* 142:434-445.
- El-Komy, H.M.A. 2005. Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food Technology and Biotechnology* 43:19-27.
- Fernández, L.; Zalba, P.; Gómez, M. 2005. Bacterias solubilizadoras de fósforo inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cienc. Suelo* 23(1):31 -37.
- Ferrán, J.; Bach, T.; Delgado, A.; Vásquez, H.; Deyta, M. 2000. Efecto de la aplicación de inoculantes mixtos sobre el desarrollo de diferentes cultivos. 30° Congreso Nacional de la SMCS, sep., Veracruz - México.
- French, E.; Hebert, T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica. IICA. 289 p.
- García, C. 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. GGHT Ediciones y Mundi-Prensa, España, 371p.
- Goldstein, A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*. 1:51-70.
- Goldstein, A.H.; Liu, S.T. 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Biotechnology* 5:72-74.
- Goldstein, A.H.; Rogers, R.D.; Mead, G. 1993. Separating phosphate from ores via bioprocessing. *Biotechnology* 11:1250-1254.
- Guerrero, E. 1996. Micorrizas recurso biológico del suelo Colombia: Fondo FEN.208p.

- Gupta, S.C.; Namdeo, S.L. 1997. Effect of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacteria and FYM on nodulation, grain yield and quality of chickpea. *Indian Journal of Pulses Research* 10:171–174.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41:109–17.
- Glick, B.R.; Changping, L.; Sibdas, G.; Dumbrof, E.B. 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting *Rhizobacterium Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biology and Biochemistry*. (29):1233–1239.
- Glick, B.R.; Penrose, D.M.; Li, J.A. 1998. Model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology* 190:63–68.
- Halvorson, H.; Keynan, A.; Kornberg, H. 1990. Utilization of calcium phosphates for microbial growth at alkaline pH. *Soil Biology and Biochemistry* 22:887- 890.
- Hall, J.A.; Pierson, D.; Ghosh, S.; Glick, B.R. 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting *rhizobacterium*, *Pseudomonas putida* GR12-2. *Israeli Journal of Plant Sciences* 44:37– 42.
- Han, H.; Supanjani, and Lee, K. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant and Soil Environment* 52(3): 130–136.
- Himani, S.; Sudhakara, R. 2010. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology* 47(2011): 30 -34.
- Höfte, M.; Altier, N. 2010. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology* 161(6):464-71.
- Illmer, P.; Schinner, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates, solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 27(3):257-263.

- Illmer, P.; Barbato, A.; Schinner, F. 1995. Solubilization of hardly-soluble AlPO_4 with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 27(3):265-270.
- Illmer, P.; Schinner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* (24):389-395.
- Jain, P.C.; Kushawaha, P.S.; Dhakal, U.S.; Khan, H.; Trivedi, S.M. 1999. Response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to phosphorus and biofertilizer. *Legume Research* 22:241-244.
- Jurinak, J.; Dudley, L.; Allen, M.; Knight, W. 1986. The role of calcium oxalate in the availability of phosphorus in soils of semiarid regions: a thermodynamic study. *Soil Science* 142:255-261.
- Kaila, A. 1949. Biological absorption of phosphorus. *Soil Science* 68(4): 279-289.
- Kannapiran, E.; Ramkumar, V. 2011. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the sediments of Thondi coast, Southeast coast of India. *Annals of Biological Research* 2(5): 157 – 163.
- Kapulnik, J.; Gafny, R.; Okon, Y. 1985. Effect of *Azospirillum* spp. Inoculation on root development and NO_3^- uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic systems. *Canadian Journal of Botany* 63:627–631.
- Kim, K.Y.; Jordan, D.; McDonald, G.A. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology Fertility of Soils* 26:79-87.
- Konietzny, U.; Greiner, R. 2004. Bacterial phytase: potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology* 35: 11-18.
- Kucey, R.; Janzen, H.; Legget, M. 1989. Microbial mediated increase in plant available phosphorus. *Advances in Agronomy* 42: 199-228.
- Kucey, R. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science* 63:671-678.

- Khan, M.S.; Zaidi, A.; Ahemad, M.; Oves, M.; Wani, P.A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives Agronomy and Soil Science* 56(1): 73–98.
- Khurana, A.S.; Sharma, P. 2000. Effect of dual inoculation of phosphate solubilizing bacteria, *Bradyrhizobium* sp. (cicer) and phosphorus on nitrogen fixation and yield of chickpea. *Indian Journal of Pulses Research* 13:66-67.
- Kloepper, J.W.; Schroth, M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Station de pathologie vegetale et phyto-bacteriologie, editor. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Vol II. Tours: Gilbert-Clary pp. 879–82.
- Kloepper, J.W. 1994. Plant growth promoting bacteria (other systems). En: Okon J, editor. *Azospirillum/plant association*. Boca Raton, FL: CRC Press pp. 137–54.
- Kloepper, J.W.; Lifshitz, K.; Schroth, M.N. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas of Science, Animal and Plant Science Institute for Public Information, Philadelphia* pp. 60–64.
- Kloepper, J.W.; Lifshitz, K.; Zablutowicz, R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* 7:39–43.
- Kpumblekoy, D.; Tabatabai, M.A. 1998. Effect of organic acids on the release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science* 158:442 – 453.
- Krasilnikov, M. 1961. On the role of soil bacteria in plant nutrition. *Journal of Genetics and Applied Microbioly* 7:128–44.
- Lapeyrie, F.; Ranger, J.; Varelles, D. 1991. Phosphate solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. *Canadian Journal of Botany* 69:342-346.
- Lara, C.; Esquivel A.; Negrete, P. 2011. Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba – Colombia. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 9:114 – 120.
- Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 24:187–208.

- Lei, X.G.; Porres, J.M. 2003. Phytase enzymology, applications and biotechnology. *Biotechnology Letters* 25:1787–1794.
- Leggett, M.; Cross, J.; Hnatowich, G.; Holloway, G. 2007. Challenges in commercializing a phosphate-solubilizing microorganism: *Penicillium bilaiae*, a case history. En: Velázquez, E and Rodríguez-Barrueco, C (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. 215-222.
- Lemanceau, P. 1992. Effets benefiques de rhizobacteries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp. Fluorescent. *Agronomie* 12: 413-437.
- Liu, S.; Lee, L.; Tai, C.; Hung, C.; Chang, Y.; Wolfram, J.; Rogers, R.; Goldstein, A. 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilisation in *E. coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology* 174:5814-5819.
- Marschner, P. 2007. Plant-microbe interactions in the rhizosphere and nutrient cycling. En: Marschner, P; Rengel, Z (Eds). *Nutrient cycling in terrestrial ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin 159-181 pp.
- Mathur, B.S.; Sarkhar, A.K.; Mishra, B. 1980. Release of nitrogen and phosphorus from compost charged with rock phosphate. *Indian Journal of Soil Science* 28(2): 206-212.
- Mehrvarz, S.; Chaichi, M.R. 2008. Effect of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on forage and grain quality of barley (*Hordeum vulgare* L.). *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 3(6): 855-860.
- Moura, R.; Martin, J.; Martin, A.; y Liras, P. 2001. Substrate analysis and molecular clonig of the extracellular alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 147: 1525-1533.

- Moreno - Sarmiento, N.; Moreno - Rodríguez, L.F.; Uribe, D. 2007. Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. En: Izaguirre, M.; Labandera, C y Sanjuan, J. (eds) *Biofertilizantes en Iberoamérica: Visión técnica, científica y empresarial*, vol 1. Denad Internacional, Montevideo, pp 38 – 45.
- Mulder, E. 1969. Biology and soil fertility. In: soil biology, reviews of research. *Natural Resource Research* UNESCO P 163-208.
- Naik, P.R.; Raman, G.; Narayanan, K.N.; Sakthivel, N. 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiology* 8: 230.
- Narsian, V.; Thakkar, J.; Patel, H. 1993. Solubilization of natural rock phosphates and pure insoluble inorganic phosphates by *Aspergillus awamori*. *Indian Journal of Experimental Biology* 31: 747-749.
- Ñustes, E.; Acevedo, C. 2005. Evaluación del uso de *Penicillium janthinellum* Biourge sobre la eficiencia de la fertilización fosfórica en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. var. Diacol Capiro) *Agronomía Colombiana* 23(2):290 – 298.
- Omar, S.A. 1998. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and Vesicular-Arbusular-Mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbial Biotechnology* 14: 211-218.
- Onthon, J.; Gimsanguan, S.; Pengnoo, A.; Nilnond, C.; Osaki, M. 2007. Effect of pH and some cations on activity of acid phosphatase secreted from *Ustilago* sp. isolated from acid sulphate soil. *Songklanakarín Journal of Science and Technology* 29:275 – 286.
- Pant, H.; Warman, P. 2000. Enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus by immobilized phosphatases. *Biology and Fertility of Soils* 30: 306-311.
- Parks, E.; Olson, G.; Brinckman, F.; Baldi, F. 1990. Characterization by high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilization of phosphorus in iron ore by a fungus. *Journal of Industrial Microbiology* 5:183-190.

- Patiño, T. 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia. Tesis Doctoral. Especialidad Manejo de Suelos y Aguas. Universidad Nacional de Colombia.
- Picone, L.I.; Zamuner, E. 2002. Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* 16: 11 – 15.
- Pradhan, N.; Sukla, L. 2005. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology* 5(10):850-854.
- Quiquampoix, H.; Mousain, D. 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. En: Turner B.L; Frossard, E and Baldwin, D.S. Organic phosphorus in the environment. CAB International. 89-108 pp.
- Rashid, M.; Khalil, S.; Ayub, N.; Alam, S.; Latif, F. 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganism (PMS) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(2): 187-196.
- Reyes, I.; Bernier, L.; Antoun, H. 2002. Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. *Microbial Ecology* 44: 39 - 48.
- Rigde, E.; Rovira, A. 1971. Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and non – sterile conditions. *New Phytologist* 70:171 – 1026.
- Rodríguez, H.; Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth-promotion. *Biotechnology Advances* 17:319-339.
- Rodríguez, H.; Fraga, R.; Gonzalez, T.; Bashan, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 56(3):492-504.
- Rodríguez, H.; Gonzalez, T.; Selman, G. 2000. Expression of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *Journal of Biotechnology* 84:155-161.

- Rojas, S.; Moreno, S. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(2):50-62.
- Rudresh, D.L.; Shivaprakash, M.K.; Prasad, R.D. 2005. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). *Applied Soil Ecology* 28:139-146
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Sabry, S.; Saleh, S.; Batchelor, C.; Jones, J.; Jotham, J.; Webster, J.; Kothari, S.; Davey, M.; Cocking, E. 1997. Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proceedings: Biological Sciences* 264(1380):341-346.
- Sackett, W.G.; Patter, A.J.; Brown, C.W. 1908. The solvent action of soil bacteria upon the insoluble phosphates of raw bone meal and natural raw rock phosphates. *Zentralblatt fuer Bakteriologie: International journal of Medical Microbiology* 28:688-703
- Salazar, J. 2005. El fósforo en los sistemas ganaderos de leche *Agronomía Mesoamericana* 16(002): 231-238.
- Sarig, S.; Okon, Y.; Blum, A. 1990. Promotion of leaf area development and field in *Sorghum bicolor* inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis* 9:235-45.
- Sarma, M.V.; Saharan, K.; Prakash, A.; Bisaria, V.S.; Sahai, V. 2009. Application of fluorescent pseudomonads inoculant formulations on *Vigna mungo* through field trial. *International Journal of Biological and Life Sciences* 5(1) 25-29.
- Sivan, A.; Chet, I. 1992. Microbial control of plant diseases. En: Mitchell, R. (ed.) *Environmental microbiology*. New York: Wiley-Liss. pp. 335-54.
- Soil Survey Staff. 2010. Keys to Soil Taxonomy. 11 ed. USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington, DC. 365 p.

- Subba Rao, N.S. 1982. Advances in agricultural microbiology. En: Subba Rao, N.S. (ed.) Studies in the Agriculture and Food Sciences. London: Butterworth Scientific, pp. 295–303.
- Supanjani; Shim, H.; Sung, J.; Dong, L. 2006. Rock phosphate-potassium and rock-solubilising bacteria as alternative, sustainable fertilisers. *Agronomy for Sustainable Development* 26(4): 233-240.
- Suslov, T.V. 1982. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. En: Mount MS, Lacy GH, editors. Phytopathogenic prokariotes. London: Academic Press. pp. 187–223.
- Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 373 p.
- Sharan, A.; Shikha, S.; Darmwal, N.; Gaur, R. 2008. *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline-alkali soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(6): 753-759.
- Steenhoudt, O.; Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Review* 24:487-506.
- Stumm, W.; Morgan, J. 1995. Aquatic Chemistry: Chemical equilibria and rates in Natural Waters. 3rd ed. New York, John Wiley. 1992 p.
- Taha, S.; Mahmoud, S.; El-Damaty, A.; El-Hafez, A. 1969. Activity of phosphate dissolving bacteria in Egyptian soils. *Plant and Soil* 31:149-160.
- Tantawy, M.E.; Mohamed, M.A.N. 2009. Effect of Inoculation with Phosphate Solubilizing Bacteria on the Tomato Rhizosphere Colonization Process, Plant Growth and Yield under Organic and Inorganic Fertilization. *Journal of Applied Sciences Research* 5(9):1117-1131.
- Toro, M., Azcón, R.; Barea, J. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to

improve rock phosphate bioavailability (^{32}P) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology* 63(11):4408 – 4412.

Torre, M.; Gomez, A.G.; Vizcaino, C.; Garcia, M. 1993. Biochemical mechanisms of stone alteration carried out by filamentous fungi living in monuments. *Biogeochemistry* 19:129-147.

Trivedi, P.; Sa, T. 2008. *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Current Microbiology* 56:140–144.

Tsai, S.; Rossetto, R. 1992. Transformações microbianas do fósforo. In *Microbiologia do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Campinas, Brasil.

Useche, Y.; Valencia, H.; Pérez, H. 2004. Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el sur del trapecio amazonico. *Acta Biológica Colombiana* 9 (2):42 – 45.

Vaccari, D. 2009. La crisis del fósforo. Investigación y ciencia; Edición española de Scientific American. España pp. 22-27.

Valverde, A.; Burgos, A.; Fiscella, T.; Rivas, R.; Velazquez, E.; Rodríguez, B.; Cervantes, E.; Chamber, M. 2007. Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. En: Velázquez, E.; Rodríguez-Barrueco, C (eds.). *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. 43-50 pp.

Vargas, R. 2012. *Microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos*. Monografía. Universidad Industrial de Santander Colombia.

Vasquez, P.; Holguin, G.; Puente, M.; Lopez, A.; y Bashan, Y. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils* 30:460 - 468.

- Vassileva, M.; Vassilev, N.; Azcón, R. 1998. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* on olive cake-based medium and its further application in a soil-plant system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14: 281-284.
- Vassilev, N.; Fenice, M.; Federici, F. 1996. Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variable* P16. *Biotechnology Techniques* 10:585-588.
- Vassilev, N.; Medina, A.; Azcón, R.; Vassileva, M. 2007. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. In: En: Velázquez, E.; Rodríguez-Barrueco, C (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer. 77-84.
- Vera, D.; Pérez, H.; Valencia, H. 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de Arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biológica Colombiana* 7(1): 33 – 40.
- Wakelin, S.; Warren, R.; Harvey, P.; Ryder, M. 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils* 40: 36–43.
- Wasule, D.; Wadyalkar, S.; Buldeo, A. 2007. Effect of phosphate solubilizing bacteria on role of Rhizobium on nodulation by soybean. En: Velázquez, E.; Rodríguez-Barrueco, C (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. 139-142.
- Widada, J.; Damarjaya, D. and Kabirun, S. 2007. The interactive effects of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria on the growth and nutrients uptake of sorghum in acid soil. En: Velázquez, E.; Rodríguez-Barrueco, C (eds.). First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. 173-177.
- Whitelaw, T.; Harden, G. 1997. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. *Australian Journal of Soil Research* 35: 291 - 300.

- Xie, H.; Pasternak, J.; Glick, B. 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Current Microbiology* 32:67–71.
- Xiong, A.S.; Yao, Q.; Peng, R.; Li, X.; Fan, H.; Guo, M.; Zhang, S. 2004. Isolation, characterization, and molecular cloning of the cDNA encoding a novel phytase from *Aspergillus niger* 113 and high expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37(3): 282-291.
- Yadav, K.; Singh, T. 1991. Phosphorus solubilization by microbial isolate from a Calcifluvent. *Journal of Indian Society of Soil Science* 39:89-93.

IX. ANEXOS

ANEXO 1: ANVA de altura de la biomasa aérea en maíz

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	306.4	306.4	3.806	0.06046.
Cepa	4	1409.4	352.4	4.378	0.00660 **
Cepa:Sustrato	4	1730.3	432.6	5.374	0.00219 **
Residuales	30	2414.7	80.5		

Códigos de Significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

ANEXO 2: ANVA de materia fresca de la biomasa aérea en maíz

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	2876	2876	3.736	0.06273.
Cepa	4	16833	4208	5.468	0.00199 **
Cepa:Sustrato	4	11519	2880	3.742	0.01384 *
Residuales	30	23090	770		

ANEXO 3 : ANVA de materia seca de la biomasa aérea en maíz

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	41.2	41.23	1.805	0.18921
Cepa	4	530.5	132.63	5.806	0.00139 **
Cepa:Sustrato	4	292.0	73.01	3.196	0.02670 *
Residuales	30	685.3	22.84		

ANEXO 4: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa aérea en maíz

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	79.0	79.05	1.188	0.284
Cepa	4	372.1	93.02	1.398	0.258
Cepa:Sustrato	4	280.9	70.22	1.056	0.395
Residuales	30	1995.4	66.51		

Universidad Nacional Agraria
Biblioteca Agrícola Nacional

- 43953

ANEXO 5 : ANVA de altura de la biomasa aérea en frijol castilla

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	6.81	6.806	2.052	0.164
Cepa	4	18.03	4.507	1.359	0.275
Cepa:Sustrato	4	16.95	4.238	1.278	0.304
Residuales	26	86.22	3.316		

ANEXO 6 : ANVA de materia fresca de la biomasa aérea en frijol castilla

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	129.5	129.52	1.630	0.213
Cepa	4	365.0	91.25	1.149	0.356
Cepa:Sustrato	4	358.9	89.73	1.129	0.364
Residuales	26	2065.6	79.45		

ANEXO 7 : ANVA de materia seca de la biomasa aérea en frijol castilla

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	3.63	3.628	1.222	0.279
Cepa	4	22.37	5.591	1.883	0.144
Cepa:Sustrato	4	20.20	5.050	1.701	0.180
Residuales	26	77.20	2.969		

ANEXO 8: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa aérea en frijol castilla

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	3.4	3.354	0.226	0.638
Cepa	4	26.4	6.594	0.445	0.775
Cepa:Sustrato	4	13.1	3.269	0.220	0.925
Residuales	26	385.6	14.830		

ANEXO 9: ANVA de altura de la biomasa aérea en haba

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	178.1	178.08	4.582	0.0406 *
Cepa	4	150.4	37.61	0.968	0.4396
Cepa:Sustrato	4	511.4	127.84	3.289	0.0238 *
Residuales	30	1166.0	38.87		

ANEXO 10: ANVA de materia fresca de la biomasa aérea en haba

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	598	598.2	1.022	0.320
Cepa	4	1583	395.8	0.676	0.614
Cepa:Sustrato	4	2477	619.2	1.058	0.394
Residuales	30	17553	585.1		

ANEXO 11: ANVA de materia seca de la biomasa aérea en haba

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	27.2	27.19	1.586	0.218
Cepa	4	95.2	23.79	1.388	0.262
Cepa:Sustrato	4	59.9	14.98	0.874	0.491
Residuales	30	514.2	17.14		

ANEXO 12: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa aérea en haba

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	259	259	0.102	0.7517
Cepa	4	17642	4410	1.735	0.1683
Cepa:Sustrato	4	22728	5682	2.235	0.0888.
Residuales	30	76258	2542		

ANEXO 13: ANVA de altura de la biomasa aérea en trigo

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	79.0	79.0	18.04	0.000193 ***
Cepa	4	619.8	155.0	35.40	5.84e ⁻¹¹ ***
Cepa:Sustrato	4	1299.1	324.8	35.40	4.07e ⁻¹⁵ ***
Residuales	30	131.3	4.4		

ANEXO 14: ANVA de materia fresca de la biomasa aérea en trigo

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	316	315.8	18.93	0.000144 ***
Cepa	4	2479	619.8	37.15	3.22e ⁻¹¹ ***
Cepa:Sustrato	4	5196	1299.1	77.86	2.11e ⁻¹⁵ ***
Residuales	30	501	16.7		

ANEXO 15: ANVA de materia seca de la biomasa aérea en trigo

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	145.7	145.66	20.86	7.89e ⁻⁰⁵ ***
Cepa	4	362.5	90.63	12.98	3.01e ⁻⁰⁶ ***
Cepa:Sustrato	4	405.8	101.46	14.53	1.04e ⁻⁰⁶ ***
Residuales	30	209.5	6.98		

ANEXO 16: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa aérea en trigo

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	48.4	48.38	1.036	0.3169
Cepa	4	647.5	161.87	3.467	0.0192 *
Cepa:Sustrato	4	222.9	55.72	1.193	0.3339
Residuales	30	1400.7	46.69		

ANEXO 17: ANVA de peso de granos en trigo

Fuente de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Sustrato	1	69.62	69.62	22.33	5.05e ⁻⁰⁵ ***
Cepa	4	242.93	60.73	19.48	5.41e ⁻⁰⁸ ***
Cepa:Sustrato	4	142.37	35.59	11.42	9.45e ⁻⁰⁶ ***
Residuales	30	93.53	3.12		

ANEXO 18: Composición del medio de Pikovskaya PKV

Composición por litro	Cantidad (g/L)
Glucosa	10.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.1
Extracto de levadura	0.5
KCl	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.002
MnSO ₄ . H ₂ O	0.002 g
Ca ₃ (PO ₄) ₃	5.0 g
pH	7.0
Agua	c.s.p. 1L

ANEXO 19: Curva patrón de fósforo

Nº	SOLUCIÓN ESTANDAR	AGUA DESTILADA	SULFO MOLIBDICA	SOL. REDUCTORA	VOLUMEN FINAL	CONCENTRACIÓN P mg/L
1	0.0 mL	18.4 mL	0.8 mL	0.8 ml	20 mL	0.0
2	0.20 mL	18.2 mL	0.8 mL	0.8 mL	20 mL	0.8
3	0.40 mL	18.0 mL	0.8 mL	0.8 mL	20 mL	1.6
4	0,60mL	17.8 mL	0.8 mL	0.8 mL	20 mL	2.4
5	0.80mL	17.6 mL	0.8 mL	0.8 mL	20 mL	3.2
6	1 mL	17.4 mL	0.8 mL	0.8 mL	20 mL	4.0

Fuente: Bazan, T 1996

Fórmula para determinar % de fósforo

<p align="center"> $\% \text{ de P} = \text{mg de P en curva} * \text{FD}$ $\text{FD} = \frac{\text{vol. extracción} * \text{vol. Final} * 1\text{g} * 100\text{g de tejido vegetal}}{100\text{ml sol extr. Alícuota } 1000\text{mg peso de muestra}}$ </p>
--

FD = Factor de dilución

ANEXO 20: Descripción de los suelos utilizados para el aislamiento

Suelo	Localidad	Paraje	Altitud msnm	Latitud	Longitud	pH*	CE_(1:1) dS m⁻¹	P₂O₅ mg kg⁻¹	CaCO₃ %	Clasificación taxonómica Soil Taxonomy (2010)
1	Aramachay	Chapampa	3698	11° 54' 25.2"	75° 24' 12.7"	7.96	0.26	4.0	33.9	Typic Ustorthents
2	Chacrampa-1	Carretera	3607	11° 54' 01.0"	75° 24' 11.8"	7.81	0.25	3.5	6.3	Typic Ustorthents
3	Chacrampa-2	Chalampachimpa	3588	11° 54' 39.5"	75° 25' 41.6"	7.46	0.82	14.7	19.1	Typic Ustorthents
4	Sincos-1	Isquilpuquio	3413	11° 54' 08.8"	75° 22' 44.8"	7.91	0.28	3.4	24.8	Typic Ustorthents
5	Chacrampa-3	Machque	3605	11° 54' 09.5"	75° 24' 23.2"	7.59	0.48	39.2	10.1	Typic Ustorthents
6	Sincos-2	Lulinmayo	3307	11° 53' 27.8"	75° 22' 57.8"	7.57	1.37	16.4	14.3	Typic Ustifluents
7	Sincos-3	Mayupata	3301	11° 53' 13.8"	75° 23' 06.9"	7.49	2.40	13.3	13.4	Typic Ustifluents
8	La Molina	Campo Libres	234	12° 04' 56.2"	76° 57' 04.9"	7.33	2.30	28.6	6.3	Ustic Torrifuents

Los análisis de caracterización se realizaron en el LASPAF-UNALM