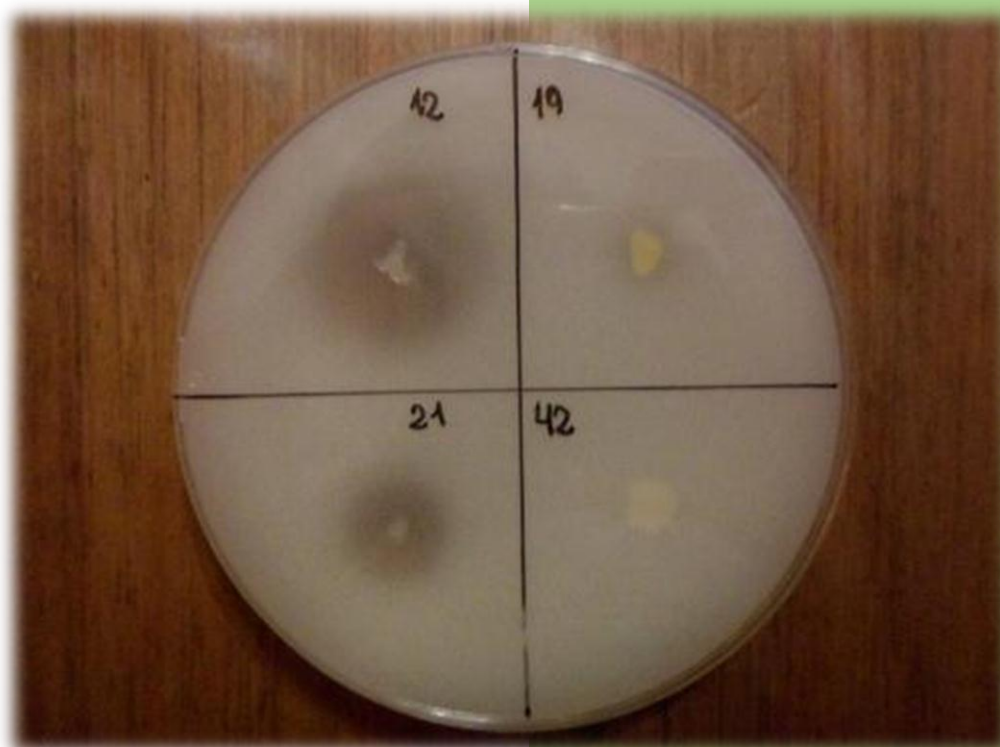


Aislamiento y selección de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo de un suelo cultivado con tomate para industria (*Solanum lycopersicum* L.)



Juan Pablo Scattareggia

INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

-2016-



Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Cuyo
Almirante Brown 500, Chacras de Coria, Mendoza
M5528AHB- (54 261) 4135000

Aislamiento y selección de Bacterias Solubilizadoras de
Fósforo de un suelo cultivado con tomate para industria
(*Solanum lycopersicum* L.)

Autor

Juan Pablo Scattareggia

Barrio San Telmo, Mazana G Casa 20
San Martín, Mendoza

juanpabloscattareggia@gmail.com

Tel. cel. (54 263) 4593991

Director

Ingeniera Agrónoma María Gabriela Lorenzo

glorenzo@fca.uncu.edu.ar

Tel. cel. (54 261) 3047366

Director Alterno

Ingeniera Agrónoma Cora Dediol

cdediol@fca.uncu.edu.ar

Tel. (54 261) 4966129

Miembros del Comité Evaluador

Dra. Ingeniera Agrónoma Laura Elisabeth Martínez

Bioquímica Silvina Farrando

Ingeniero Agrónomo Leandro Eloy Mastrantonio

RESUMEN

El desarrollo de la agricultura en el mundo involucra distintos modelos de producción. El esquema predominante responde a la aplicación de un paquete tecnológico. Este modelo agrícola convencional, si bien ha permitido incrementar los rendimientos de cosecha, no ha sabido considerar los impactos negativos que produce sobre el medio. En este punto se destaca el empleo desmedido de fertilizantes químicos, asociado a la eutrofización de cuerpos de agua, disminución de las principales reservas de nutrientes, inmovilización de nutrientes en el suelo con los consecuentes desbalances en cultivos, aumento de los costos de producción, entre otros. En un contexto de desarrollo sustentable surge el concepto de biofertilización, a partir del estudio, conocimiento y utilización de diversos microorganismos que actúan como Promotores del Crecimiento Vegetal. En la provincia de Mendoza, uno de los elementos que más limita el desarrollo de los cultivos es el fósforo, siendo por ello aplicado al suelo a partir de fuentes externas. El presente trabajo se focalizó sobre el estudio de las Bacterias Solubilizadoras de Fósforo, en particular aquellas capaces de solubilizar las formas inorgánicas del elemento. Se trabajó para ello, de forma comparativa, con un suelo implantado con tomate para industria (*Solanum lycopersicum* L.) y un suelo sin cultivar, localizados en Chacras de Coria, departamento Luján de Cuyo, Mendoza. En tres momentos fenológicos del ciclo del tomate se tomaron muestras de suelo de ambos sitios. Se determinó la presencia de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo, el número de unidades formadoras de colonia y se aislaron las formas predominantes para realizar pruebas de eficiencia. Se midieron los índices de solubilización en placa de cada cepa aislada, aquellas que presentaron los valores más altos fueron seleccionadas para realizar pruebas de solubilización en medio líquido. Durante la maduración de frutos se encontró mayor cantidad de bacterias solubilizadoras que en el momento de floración, lo que es coincidente con la mayor demanda del cultivo. En ninguna etapa se hallaron diferencias significativas entre los sitios cultivado y no cultivado respecto a dicha variable. El porcentaje de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo respecto a las bacterias aerobias mesófilas totales se incrementó de floración a maduración. La etapa de trasplante debió analizarse como un caso particular, donde el riego y los aportes de materia orgánica resultaron determinantes en la dinámica poblacional microbiana. En floración, se aislaron 33 cepas solubilizadoras, mientras que en maduración se obtuvieron 50. En ambos momentos fenológicos 9 cepas presentaron índices de solubilización mayores a 2, de las cuales 8 correspondieron a muestras de suelo cultivado y sólo una a suelo no cultivado. En trasplante, se aislaron 50 cepas, de las que sólo una presentó un índice de solubilización elevado. De las 19 cepas seleccionadas, hubo tres con una capacidad sobresaliente para solubilizar fósforo en medio líquido. Todas las cepas aisladas fueron conservadas en un cepario en freezer, en medio de cultivo adicionado con glicerol. Se sugiere realizar la identificación de las cepas y efectuar ensayos de bioinoculación con aquellas que reportaron mayor eficiencia.

PALABRAS CLAVE

Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal, Bacterias Solubilizadoras de Fósforo, *Solanum lycopersicum* L., Producción Sustentable.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos aquellos que prestaron su colaboración para que este trabajo fuese desarrollado y concluido con éxito. En particular a:

Dios, por su presencia y compañía en cada momento y en cada persona.

Mi familia, por ser quien me formó y educó como persona, dándome valores.

Mis amigos, por mantenerse fieles a mi lado dándome apoyo y consejo.

Mis profesores, por haberme dado las herramientas que me permitirán desenvolverme en el ámbito profesional. En especial, a mis directoras y evaluadores.

Bromatóloga Elisabeth Sfreddo, así como a todo el equipo de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Doctora Patricia Piccoli e Ingeniero en Recursos Naturales Renovables Iván Funes Pinter, así como a todo el equipo de la Cátedra de Química Orgánica y Biológica de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Ingeniero Agrónomo B. Ricardo Pérez Valenzuela, así como a todo el equipo de la Cátedra de Edafología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Laboratorio de Suelo, Agua y Vegetales de la Estación Experimental Mendoza del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Ingeniero Agrónomo Carlos Salcedo, así como a todo el equipo de la Cátedra de Seminario de la Facultad de Ciencias Agrarias.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Presentación e importancia del problema en estudio.....	1
1.2.	Objetivos.....	3
1.3.	Hipótesis.....	3
1.4.	Marco teórico.....	4
1.4.1.	Sustentabilidad en el manejo de agroecosistemas.....	4
1.4.2.	Dinámica del fósforo en el sistema suelo-planta.....	5
1.4.3.	Bacterias solubilizadoras de fósforo como promotoras del crecimiento vegetal.....	7
1.4.4.	Aplicación agronómica de las BSP: biofertilización.....	13
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1.	Localización de la zona de estudio.....	14
2.2.	Muestreo.....	15
2.3.	Recuentos de bacterias aerobias mesófilas y BSP.....	18
2.4.	Selección y aislamiento de cepas.....	19
2.5.	Tamaño de halos e índice de solubilización.....	20
2.6.	Conservación de cepas.....	21
2.7.	Solubilización de P en medio líquido.....	22
2.8.	Análisis de los datos.....	23
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
3.1.	Aclaración previa.....	24
3.2.	Detección y recuento de BSP y bacterias aerobias mesófilas.....	24
3.3.	Eficiencia de solubilización de las BSP.....	28
3.3.1.	Índice de solubilización.....	28
3.3.2.	P solubilizado en medio líquido.....	30
3.4.	Caso particular: etapa de trasplante.....	33
4.	CONCLUSIONES.....	35
5.	FUTURAS INVESTIGACIONES.....	35
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	36
	ANEXO.....	41
1.	Recuentos.....	41
2.	Cálculo del Índice de Solubilización (IS).....	49
3.	Cálculo del fósforo disuelto en medio líquido.....	54
3.1.	Fundamento de la técnica y preparación del reactivo colorimétrico.....	54
3.2.	Curva patrón de P.....	54
3.3.	P solubilizado por las BSP.....	55
3.4.	Listado de materiales.....	57

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Presentación e importancia del problema en estudio

En la actualidad la agricultura convencional responde al paradigma de la llamada Revolución Verde, la cual implica la adopción de un “paquete tecnológico”. Dicho paquete incluye agroquímicos, sistemas de riego tecnificado, semillas seleccionadas por su carácter genético mejorado, disminución de la diversidad (especies nativas y variedades tradicionales) en los sistemas agrícolas en favor del monocultivo y reemplazo del trabajo manual por maquinaria dependiente de combustibles fósiles (1). El empleo de dicho paquete en la producción agrícola, si bien ha permitido incrementar inicialmente los rendimientos de cosecha, no ha sabido considerar los fuertes impactos negativos que produce sobre el medio.

Respecto a la aplicación desmedida de fertilizantes químicos, los principales problemas asociados son los efectos producidos sobre suelo y agua que, en definitiva, son capaces de alterar el normal funcionamiento de los ecosistemas naturales y de los agroecosistemas.

En el caso particular del fósforo (P), su sobre aplicación en forma de sales puede favorecer el enriquecimiento del elemento en aguas subterráneas, lagos y ríos y su consecuente eutrofización (2). En zonas áridas, donde la escasez de precipitaciones determina el carácter básico de los suelos, tienden a favorecerse las reacciones de inmovilización del P. Este proceso se ve incrementado cuando la cantidad aplicada como fertilizante supera a la utilizada por los cultivos, lo que produce desbalances nutricionales en las plantas, cambios en la composición de la microbiota del suelo y un consecuente incremento en los costos de producción.

En la actualidad, ante una expansión generalizada de la conciencia por la protección del ambiente, el manejo de agroecosistemas involucra cada vez mayor número de aspectos relacionados a prácticas sustentables. Esto hace imprescindible comprender la totalidad de factores que afectan la disponibilidad del P, con el objetivo de incidir en ella, de tal modo que sea posible mejorar la nutrición de las especies de importancia económica sin proceder en contra de la calidad ambiental.

Gran parte de estas especies se cosechan para la obtención de alimentos. Al estar los alimentos destinados en su mayoría a los centros urbanos, los destinos finales de muchos de los nutrientes (vía deyecciones de los seres humanos) son los ríos y a veces, posteriormente, los océanos, lo cual ha llevado a que el flujo de nutrientes se vuelva en muchos casos abierto; esto hace que sea necesario reponerlos. En los sistemas agrícolas modernos, esto se basa casi exclusivamente en el uso de fuentes minerales (rocas) o fertilizantes sintéticos. Por lo tanto, de continuar este modelo en el largo plazo, las fuentes de nutrientes serán cada vez más escasas, y los sistemas tendrán cada vez más dificultad para reponer los nutrientes del suelo llevando a su agotamiento, ya que la mayoría de los mismos se encontrarán dispersos en los océanos. Aunque el contenido total de los diferentes nutrientes en el planeta prácticamente no varía, sí lo hace la concentración de los mismos. El flujo actual de nutrientes produce una dilución que traerá, además de importantes dificultades para encontrarlos en altas concentraciones, mayores costos energéticos y económicos para su recolección y reposición a los agroecosistemas (3).

Se sabe que la mayoría de los suelos de importancia agronómica en el planeta son deficientes en P biodisponible, por lo que éste debe ingresarse al agroecosistema desde fuentes externas. Sin embargo, el P es un recurso finito, no renovable. Lo cual, junto al hecho que los precios de los fertilizantes fosfóricos se incrementan constantemente, hace que sea necesario el uso de estrategias más sostenibles de fertilización (4).

En Mendoza no existen antecedentes acerca de los factores bióticos que afectan la dinámica del P edáfico, sin embargo es sabido que éstos tienen una fuerte influencia en el establecimiento y desarrollo de los cultivos y, por lo tanto, representan un impacto económico

directo sobre la agricultura (5). El adecuado manejo de las fertilizaciones es fundamental en el aprovechamiento de cualquier agroecosistema y es determinante en la minimización de los impactos que se generan sobre suelo y agua. El estudio de las Bacterias Solubilizadoras de Fósforo (en adelante BSP) como determinantes de la fertilidad del suelo y su potencial aprovechamiento como herramientas de inoculación en plantas constituyen entonces dos aspectos centrales de investigación en el ámbito de las Ciencias del Suelo.

Dentro de los cultivos hortícolas, el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ocupa en superficie implantada el segundo lugar a nivel nacional luego del cultivo de papa¹, con una producción de tomate para industria de 355.000 t, en una superficie de 6.775 ha, con un rendimiento medio de 52,4 t/ha. La demanda actual no es satisfecha por la producción nacional, generándose un déficit de 185.000 t. El cultivo de tomate en Cuyo se produce en una superficie de 4000 ha, con una producción 300.000 t.

En nuestra provincia el tomate para industria ocupa el cuarto lugar en cuanto a superficie implantada, luego del ajo, la papa y el zapallo². La producción es de 150.000 t en una superficie de 3000 ha con un rendimiento promedio de 52,5 t/ha. Existen antecedentes regionales de la respuesta del tomate a la fertilización fosfatada, incluso en suelos con contenidos de P elevados (6). También se sabe que sus requerimientos nutricionales cambian a lo largo de su fenología, existiendo algunas etapas que resultan críticas para la producción (Figura 1). Es por todo ello que se utilizará dicho cultivo como especie a evaluar, de forma comparativa, respecto al estado de un suelo inculito.

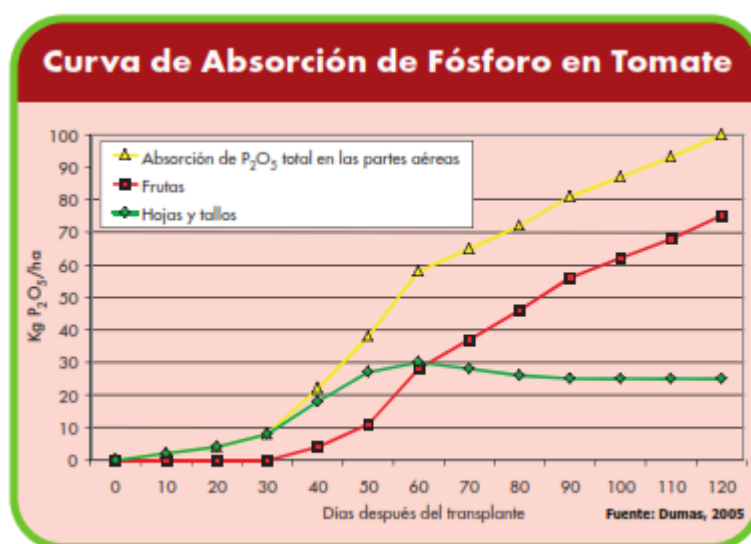


Figura 1: Absorción de fósforo en tomate cultivado al aire libre en forma de P₂O₅. Los requerimientos nutricionales en el tiempo son equiparables a otras formas de P disponibles. A partir de los 60 días del trasplante la mayor demanda la muestran los frutos (7).

¹ Secretaría de comercio interior. Corporación del mercado central de Buenos Aires
http://www.mercadocentral.gob.ar/zip tecnicas/la_produccion_de_hortalizas_en_argentina.pdf

² Estimación de la superficie cultivada con hortalizas en Mendoza Temporada 2011-2012.
<http://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2014/02/InformeTomate-2013-14.docx.pdf>

1.2. Objetivos

Objetivo general

Aislar y seleccionar las cepas de BSP más eficientes de una parcela cultivada con tomate para industria, en tres etapas de su ciclo fenológico, y de un suelo inculdo.

Objetivos específicos

- Comparar, en cada etapa, la cantidad relativa de BSP entre el suelo cultivado con tomate para industria y un suelo inculdo.
- Seleccionar aquellas cepas con potencialidad para ser empleadas como inoculantes, de acuerdo a su eficiencia de solubilización de fosfato tricálcico.
- Crear un cepario con las bacterias más eficientes en la solubilización de fosfato tricálcico para continuar su estudio en futuras investigaciones.

1.3. Hipótesis

- Existen BSP tanto en el suelo cultivado con tomate para industria como en terreno inculdo.
- La cantidad de BSP presentes en el suelo es diferente en las distintas etapas fenológicas del tomate consideradas, siendo mayor en el suelo cultivado que en el campo inculdo en cada una de las etapas.
- Del total de aislamientos de BSP realizados, existen algunos con una capacidad comparativa sobresaliente para la solubilización de fosfato tricálcico y la mayor proporción de éstos corresponde a cepas obtenidas de suelo rizosférico.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Sustentabilidad en el manejo de agroecosistemas

Un agroecosistema puede ser descrito como el conjunto de componentes bióticos y abióticos relacionados, en un tiempo y espacio determinados, transformado y bajo control humano con el fin de producir alimentos, fibras y combustible (8). Las características de la transformación que reciben estos sistemas dependen del enfoque o construcción conceptual a la que responden sus planes de manejo. El modelo preponderante en la actualidad y a escala global es el que responde al paradigma instaurado por la Revolución Verde a partir de la década de 1960. De esta manera, la mayor parte de los modelos agrícolas de producción están basados en sistemas de explotación intensivos de la tierra; los cuales implican, entre otras condiciones, una utilización desmedida de materiales que son ingresados al sistema en pos de alcanzar los mayores rendimientos de cultivo.

Entre los insumos utilizados en la agricultura convencional se puede identificar a los compuestos agroquímicos, plaguicidas y fertilizantes, cuyo uso indiscriminado puede generar graves efectos negativos sobre la calidad ambiental de suelos y agua (9). Respecto a los fertilizantes, un ejemplo claro lo constituye la eutrofización de los cuerpos de agua (ríos, mares, cursos de riego, lagos y embalses), dada por el enriquecimiento de los mismos con nutrientes, fundamentalmente nitrógeno y fósforo, que alteran la calidad del agua para consumo humano o usos recreativos, además de tener consecuencias negativas para la vida acuática (10). Aunque tanto el nitrógeno como el fósforo contribuyen a la eutrofización, la clasificación del estado trófico normalmente se basa en el nutriente que representa una limitación. En la mayoría de los casos, el factor de limitante es el fósforo (2).

Cuando un cuerpo de agua se vuelve eutrófico, la proliferación del fitoplancton se ve notablemente favorecida. Las poblaciones de estos organismos crecen hasta alcanzar una fase estacionaria, tras la cual decaen. La muerte de las poblaciones de fitoplancton genera depósitos de materia orgánica, los cuales estimulan el crecimiento explosivo de microorganismos heterótrofos y aerobios, en su mayoría bacterias. Estos consumen gran parte del oxígeno disuelto en el agua, por medio de la respiración, causando la sofocación de peces y crustáceos. Al mismo tiempo, las bacterias anaerobias aparecen en el fondo produciendo gases como el amoníaco y el sulfuro de hidrógeno que resultan tóxicos (2). En Mendoza existen algunos antecedentes sobre la eutrofización de ríos y embalses. Tal es así que, tras mediciones realizadas en los años 2001 y 2002, el embalse El Carrizal fue clasificado como eutrófico e, incluso, hipertrófico en algunos sectores (11); destacándose entre las posibles causas el aporte difuso de nutrientes, derivados de las zonas cultivadas aguas arriba. Por su parte, un estudio en el río Mendoza, entre los años 2003 y 2011, reveló un aumento en el contenido de fosfatos en el sentido aguas arriba-aguas abajo; el cual podría ser atribuido a las actividades agrícolas, industriales y urbanas del oasis Norte de la provincia (12).

La energía es un recurso imprescindible para la existencia y el manejo de los agroecosistemas. En las últimas décadas, los modelos de producción predominantes han permitido aumentar los rendimientos de los cultivos. Sin embargo, el uso de insumos, maquinaria y combustibles también se ha incrementado, haciéndolo en forma más que proporcional. Por lo tanto, la eficiencia energética (energía cosechada por unidad de energía utilizada) ha disminuido, lo que significa que cada vez se requiere más energía para producir aumentos en los rendimientos (10). En algunos sistemas, la proporción de energía renovable representa sólo del 7 a 16% de la energía primaria total utilizada, mostrando la alta dependencia de energía no renovable de los modelos intensivos de agricultura (13).

Es a raíz de la preocupación por la calidad del ambiente que surgen modelos de producción alternativa y sostenible, algunos de los cuales se traducen en una fuerte ruptura con la agricultura convencional y abordan un enfoque diferente desde la ciencia agroecológica. Según la FAO *“la agricultura sostenible debe garantizar la seguridad alimentaria mundial y al*

mismo tiempo promover ecosistemas saludables y apoyar la gestión sostenible de la tierra, el agua y los recursos naturales...debe satisfacer las necesidades de las generaciones presentes y futuras de sus productos y servicios, garantizando al mismo tiempo la rentabilidad, la salud del medio ambiente y la equidad social y económica” (14). Entre los principios claves en el proceso de transición a la alimentación y la agricultura sostenibles cabe mencionar la conservación y protección de los recursos naturales, la protección del bienestar social y la mejora de la eficiencia en el uso de los recursos.

Uno de los enfoques que procura lograr esta mayor eficiencia de uso, es el de la Producción Integrada. Esta mirada prioriza la utilización de métodos naturales de regulación, para lograr un manejo racional de todos los elementos del agroecosistema (15).

En tal aspecto, el suelo constituye un elemento clave, y se lo puede definir como *un sistema complejo, dinámico y heterogéneo, con características físicas, químicas y biológicas tendientes a alcanzar un equilibrio con el ambiente en el que se desarrolla* (16). Un adecuado manejo de suelos resulta fundamental para su protección y conservación como recurso, punto que adquiere aún mayor relevancia en agroecosistemas de zonas áridas debido a su particular fragilidad ante cualquier impacto.

Entre los principales aspectos que contempla el manejo integrado del suelo se encuentra el manejo de su fertilidad, el cual debe tender a favorecer el ciclado de nutrientes y a disminuir la cantidad de residuos que son eliminados del sistema (17).

1.4.2. Dinámica del fósforo en el sistema suelo-planta

El uso de los suelos para agricultura convencional, exige un aporte constante de minerales para hacer crecer el cultivo y lograr una buena cosecha. Como la producción agropecuaria es constante, cada año se le extrae al suelo una gran cantidad de minerales que no se reponen naturalmente en la misma cantidad, por lo que para continuar explotando el sustrato es necesario incorporar al mismo los elementos perdidos.

Uno de los elementos nutricionales de mayor trascendencia para las plantas es el P. En suelos agrícolas carentes de formas disponibles del mismo, se vuelve uno de los elementos que se aplica en mayor proporción como fertilizante. La llamada dinámica del P involucra su movimiento en el suelo desde las formas menos disponibles a las más disponibles para ser absorbidas por las plantas así como su camino inverso.

El fósforo es un nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento biológico, se encuentra presente en toda la planta, siendo especialmente importante en los tejidos jóvenes y órganos de reserva. Es absorbido en forma de fosfato diácido (monovalente) o monoácido (divalente) y una de sus principales funciones es la de transferencia y almacenamiento de energía metabólica en forma de Adenosín Trifosfato (ATP). La deficiencia de fósforo trae serias consecuencias, tales como el desarrollo inadecuado del sistema radicular, lo que disminuye la absorción de nutrientes, la elongación de las hojas (las cuales denotan una coloración azul verdosa) y la captación de agua. También se produce un retardo en la formación de semillas y la maduración de frutos (18). En las plantas, los principales procesos bioquímicos, la fotosíntesis y la respiración, son activados por el P inorgánico y/o sus derivados orgánicos. Los ésteres de fosfato actúan, en general, como portadores energéticos en varias rutas metabólicas y como precursores de los ácidos nucleicos, mientras los fosfolípidos juegan papel importante en la integridad y función de las membranas celulares (4).

Los dos mecanismos por los cuales las plantas toman P del suelo son absorción directa y absorción mediada por hongos formadores de micorrizas, siendo esta última modalidad la que predomina cuando está presente (19). En cualquier caso, el vegetal sólo puede incorporar formas solubles de P.

En el siguiente esquema (Figura 2) se muestran las relaciones entre el ciclo del P y los componentes orgánicos y minerales de mayor importancia. Los recuadros negros constituyen las entradas al sistema, los grises las fracciones disponibles, sin relleno las fracciones minerales; sin recuadro aparecen los procesos y factores que tienen influencia en la disponibilidad de fósforo. Este elemento proviene de las apatitas y depósitos de fosfato natural de donde es liberado a través de procesos de meteorización, lixiviación, erosión y extracción como fertilizante. El fosfato liberado paulatinamente de las apatitas lo absorben las plantas y la biomasa microbiana, luego se incorpora en la materia orgánica de los suelos y sedimentos, y nuevamente se deposita en formas minerales poco solubles. El fósforo inorgánico (Pi) se presenta generalmente fuertemente fijado en forma de fosfatos de Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} y Al^{3+} especialmente en arcillas del grupo de las caolinitas y ocluido en los óxidos de hierro y Aluminio. Incluso el P, aplicado como fertilizante puede fácilmente constituir compuestos inorgánicos inutilizables, debido a su inmovilización sobre la materia orgánica y arcillas (5).

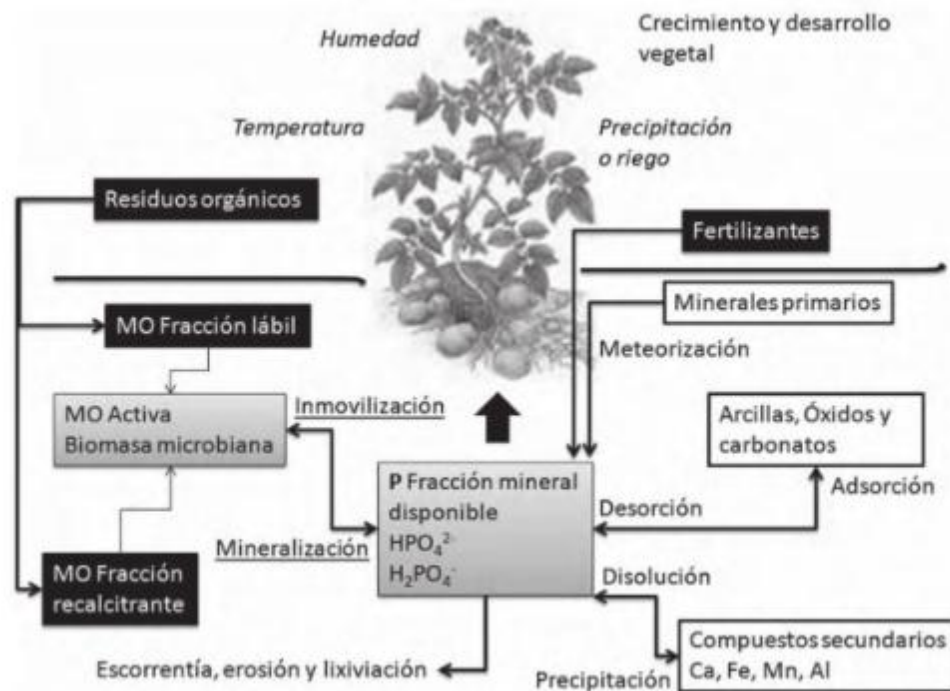


Figura 2: Esquema del ciclo del fósforo (5).

El pH del medio determina las proporciones de los tres aniones ortofosfóricos posibles: mono, di o trivalentes. Así, a pH 7.2, cerca del 50 % del fósforo inorgánico se presenta como H_2PO_4^- y el otro 50 % como HPO_4^{2-} ; a mayor acidez mayor es la proporción relativa de la forma monovalente y a mayor basicidad mayor es la de la forma divalente. La forma trivalente de PO_4^{3-} existe sólo en trazas en los suelos. Las sales de estos aniones se conocen genéricamente como fosfatos, cuya solubilidad depende del tipo de cationes que las forman. Por otro lado la presencia de ciertos cationes en el suelo, solubles a determinados pH, puede dar origen a compuestos insolubles. Por ejemplo, a pH menores de 6.5 existe mayor solubilidad de los hidróxidos de hierro y aluminio presentes en el suelo, por lo que una parte de los cationes de Fe^{+3} y Al^{+3} que los constituyen pasan a la solución edáfica. Estos cationes reaccionan con el ion H_2PO_4^- (que se encuentra en mayor proporción que la forma divalente) y originan fosfatos insolubles de hierro y/o aluminio, pasando a un estado no asimilable. Cuando el pH es muy bajo reacciona la mayor parte del H_2PO_4^- contenido en la solución, quedando muy poco fósforo a disposición de las plantas. En la provincia de Mendoza, gran parte de los suelos se encuentran saturados con calcio, lo que establece un pH de 7.5 a 8.5, predominando la forma divalente. En tal situación se forman compuestos de CaHPO_4 , (fosfato

dicálcico) más insoluble que el fosfato monocálcico $\text{Ca}(\text{PO}_4\text{H}_2)_2$. La forma monocálcica es más soluble y asimilable por las plantas. A pH de 8.5 a 9 o más se forma Na_2HPO_4 , que es una forma de fosfato más soluble que todas las anteriormente vistas, pero en esos pH existen otros graves problemas edafológicos que no permiten el crecimiento normal de las plantas. En suelos cercanos a pH 7, cuando existe humus y éste se encuentra en forma de humato de calcio, los iones H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , quedan adsorbidos a las partículas de humus por intermedio del calcio que sirve de puente de unión. Estos iones fosfato adsorbidos pasan con mayor facilidad a la solución del suelo, sin que haya fijación irreversible. Los iones fosfato, por lo tanto, quedan protegidos por el humus de los procesos de insolubilización y fijación irreversible (20).

La dinámica del fósforo en Mendoza tiende a favorecer la formación de compuestos no disponibles. Es por este motivo que en los suelos de uso agrícola de la provincia el contenido total de P alcanza 500 ppm, mientras que la fracción disponible para las plantas se encuentra entre 5 a 20 ppm (21). La fertilización con fosfatos inorgánicos implica también que una parte significativa de ellos sea inmovilizada en el suelo y como consecuencia no pueda ser aprovechada por los cultivos; en algunos suelos más del 80 % del P aplicado se vuelve inmóvil (22). Una forma de movilizar el fósforo insoluble del suelo y aumentar la eficiencia de las fertilizaciones es a través de la participación de microorganismos (hongos, bacterias y actinomicetes) que tienen la capacidad de solubilizarlo.

1.4.3. Bacterias solubilizadoras de fósforo como promotoras del crecimiento vegetal

La mayor actividad microbiológica del suelo se realiza desde la superficie hasta unos 20 centímetros de profundidad. Las colonias de microorganismos permanecen adheridas a las partículas de arcilla y humus (fracción coloidal) y a las raíces de las plantas que les suministran sustancias orgánicas que les sirven de alimento y estimulan su reproducción. La mayoría de las bacterias del suelo importantes para las plantas son heterótrofas, aerobias y mesófilas, con un rango de temperatura óptimo que va de los 15°C a los 40°C (23).

Se sabe que numerosas especies de hongos y bacterias participan en el ciclo biogeoquímico del P y promueven su movimiento a través del sistema suelo-planta, adquiriendo por ello gran relevancia en la nutrición vegetal (5). Estos Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (MSP) son capaces de crecer en medios con fosfato tricálcico, apatita u otros compuestos insolubles como única fuente de P y muestran la propiedad de solubilizarlo no sólo para su propia incorporación sino en cantidades muy superiores que son luego liberadas al medio (24).

En 1903 se realizaron los primeros estudios acerca de la capacidad solubilizadora de fosfatos de algunas bacterias. Desde entonces, diversos géneros de interés han sido aislados de suelos en todo el mundo (Tabla 1). Las BSP pueden ser de vida libre en el suelo o establecer relaciones de asociación con las plantas; en este último caso, son capaces de colonizar y persistir en la rizósfera del vegetal y favorecer su crecimiento y desarrollo, al tiempo que se benefician con las sustancias de carbono liberadas por las raíces como exudados (9). En tal sentido es que se las identifica como bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB, por sus siglas en inglés (25).

Tabla 1: Principales géneros de BSP reconocidos a nivel mundial (9).

<i>Achromobacter</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Rahnella</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Ralstonia</i>
<i>Aereobacter</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Kitasatospora</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Sinorhizobium</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Streptosporangium</i>
<i>Chryseobacterium</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Delftia</i>	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Yarowia</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	

1.4.3.1. Relación BSP-rizósfera

La rizósfera de una planta se puede definir como el volumen de suelo que está influenciado por la actividad propia de su sistema de raíz, siendo la zona del suelo que más sufre los efectos producidos por los compuestos liberados por la misma. El sistema radicular vegetal posee capacidad para excretar compuestos con una significativa diversidad de propiedades físicas y químicas a la rizósfera, como una respuesta al estrés o a fluctuaciones de tipo bióticas y abióticas. En base a ello, se define el fenómeno de rizodeposición como la liberación de toda forma de carbono a partir de las raíces.

Dentro de los productos de la rizodeposición se puede encontrar a los exudados y las secreciones, siendo la diferencia entre ambos que para el exudado los compuestos son pasivamente liberados, mientras que en la secreción lo son activamente. En las secreciones se incluye a los carbohidratos poliméricos y enzimas. Los exudados involucran tanto compuestos de peso molecular elevado (como el mucílago) como compuestos de bajo peso molecular, entre los que se encuentran ácidos orgánicos, azúcares y fenoles simples, aminoácidos, flavonoides e incluso vitaminas.

Es importante destacar que diversos autores afirman que la composición y cantidad de compuestos exudados por la raíz, dependen marcadamente de la fenología de la planta (26, 27). Además, la dinámica de liberación de compuestos orgánicos desde la raíz afecta de manera decisiva la biomasa microbiana, ciclo de nutrientes y descomposición de la materia orgánica.

Los microorganismos asociados a la rizósfera, capturan y asimilan compuestos de bajo peso molecular liberados pasivamente desde la raíz. De esta forma mantienen un gradiente de carbono entre el tejido radical interno y la solución de suelo, contribuyendo al flujo de las sustancias desde el interior al exterior de las plantas. Adicionalmente, la microbiota del suelo puede sintetizar enzimas o metabolitos capaces de alterar la integridad de las células de la raíz, o la permeabilidad de sus membranas, modificando sus funciones normales de exudación. Es por ello que, en general, se considera que estos exudados son modificados por la presencia de los organismos del suelo, tanto cualitativamente como cuantitativamente (26).

Hay estudios que sugieren que, cuando existen microorganismos solubilizadores de fósforo en la rizósfera, se hallan en mayor concentración y son más eficientes que aquellos

encontrados en suelo no rizosférico. Posiblemente ello se debe a que los exudados radicales y detritos vegetales proporcionan el sustrato energético para que sea posible la actividad microbiológica solubilizadora (9). En tal sentido, diversas cepas de BSP se han aislado de cultivos de importancia económica alrededor del mundo, tal como se muestra en la siguiente tabla (28).

Tabla 2: Bacterias solubilizadoras de P aisladas de diferentes cultivos de importancia económica (28).

Cultivo de Procedencia	Bacteria	Índice de solubilización de fosfato (NBRIP- pH 7.0)	Cuantificación de P soluble en medio NBRIP liquido (mg P L ⁻¹)
<i>Oryza sativa</i> L.	<i>Pseudomonas putida</i> AI05	2,41	nd
	<i>Pseudomonas putida</i> AJ13	2,14	nd
	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5	2.61	239.0
	<i>Burkholderia vietnamienses</i> AR1125	2.88	226.0
	<i>Burkholderia kururiensis</i> AR2236	2.30	206.0
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> H18	nd	17.0
	<i>Herbaspirillum</i> sp. ZA15	nd	15.8
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Enterobacter</i> sp. TVL1	5.0	189.5
	<i>Enterobacter</i> sp. TVL2	4.26	192.5
	<i>Pseudomonas putida</i> PSO14	4.32	144.0
<i>Brassica campestris</i> L.	<i>Pseudomonas poae</i> CPBE 37	2.33	301.3
	<i>Pseudomonas poae</i> CPBE 42	1.78	299.0
	<i>Pseudomonas poae</i> CPBE 43	2.83	440.9
	<i>Pseudomonas trivalis</i> CPBE 31	4.33	247.9
	<i>Pseudomonas trivalis</i> CPBE 40	1.11	276.9
	<i>Pseudomonas trivalis</i> CPBE 44	1.63	282.1
	<i>Rhizobium radiobacter</i> CPBE 30	2.33	326.4
<i>Saccharum officinarum</i> L.	<i>Pantoea</i> sp. 9C	6.00	
	<i>Brevibacillus borstelensis</i> B65	nd	308.0
Plantas ornamentales	<i>Bacillus cereus</i> B3	nd	259.0
	<i>Bacillus thioeparans</i> B53	nd	428.0
	<i>Paenibacillus rhizospherae</i> B89	nd	252.0
	<i>Paenibacillus lautus</i> B9 6	nd	312.0
	<i>Bacillus subtilis</i> SR/ B-16	nd	170.0
<i>Coffea arabica</i> L.	<i>Herbaspirillum</i> sp. C4	4.70	nd
	<i>Herbaspirillum</i> sp. C8	6.37	nd
	<i>Herbaspirillum</i> sp. C9	4.64	nd
	<i>Azospirillum</i> sp. C7	3.04	nd

nd – No determinado.

1.4.3.2. Mecanismos biológicos de solubilización del fósforo inorgánico

Los microorganismos capaces de solubilizar fósforo deben su capacidad fisiológica a un conjunto de reacciones bioquímicas propias de dicho grupo funcional. Se conoce que el principal mecanismo por el cual las BSP consiguen la liberación del P de los suelos en los que

de alguna forma se encuentra inmovilizado es la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (25).

Estos ácidos, entre los que se puede mencionar el ácido glucónico, cítrico, oxálico, láctico y succínico (Figura 3), son liberados por las células producto de la descomposición de las sustancias carbonadas (carbohidratos, péptidos y lípidos) presentes en la materia orgánica o en los exudados radicales de las plantas. Su liberación provoca una disminución en el pH del medio, y el elevado número de protones compite con los sitios de adsorción coloidal del fósforo en el suelo (29). Por otro lado, los ácidos orgánicos forman complejos solubles con iones metálicos como el calcio, el magnesio, el aluminio y el hierro que se asocian a formas insolubles de P, haciendo que éste quede disponible (22). En el caso particular de los ortofosfatos de calcio, ampliamente hallados en los suelos mendocinos, los protones presentes en los ácidos convierten el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a fosfatos di y mono básicos más solubles (19), la reacción se ejemplifica en la Figura 4.

Ácido	Fórmula	Ruta biosintética	Bacteria que lo produce
Acético	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$	Oxidación incompleta de azúcares (fermentación acética)	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Láctico	$\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$	(Glucólisis) Fermentación láctica primaria	<i>Bacillus licheniformis</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Oxálico	$\text{HO}_2\text{CCO}_2\text{H}$	Ácidos tricarbónicos	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Cítrico	$\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{COHCO}_2\text{HCHO}_2\text{CO}_2\text{H}$	Ácidos tricarbónicos	<i>Erwinia herbicola</i> y <i>Yarrowia lipolytica</i>
Butírico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$	Oxidación anaerobia del piruvato	<i>Bacillus licheniformis</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Succínico	$\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	Ciclo del glioxilato y ácidos tricarbónicos	<i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Málico	$\text{HO}_2\text{CCHOHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$	Ácidos tricarbónicos	<i>Bacillus megaterium</i>
Glucónico	$\text{HO}_2\text{C}(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$	Oxidación directa de la glucosa	<i>Erwinia herbicola</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Fumárico	$\text{HO}_2\text{CCOCH}_2\text{CO}_2\text{H}$	Ácidos tricarbónicos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2-Cetoglucónico	$\text{HO}_2\text{CO}(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$	Oxidación directa de la glucosa	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Rhizobium meliloti</i> y <i>Bacillus firmus</i>

Figura 3: Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en BSP (29).

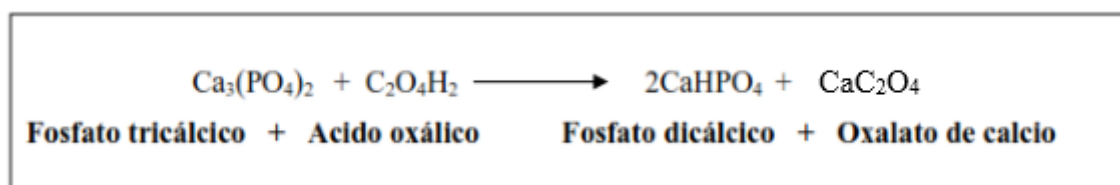


Figura 4: Reacción entre el ortofosfato de calcio y un ácido orgánico producido por BSP (19).

Otro de los mecanismos involucrados en el accionar de las BSP lo constituyen las reacciones de óxido-reducción. El fósforo se encuentra en estados de oxidación que varían del -3 en la fosfina al estado oxidado +5 del ortofosfato. Las reacciones de oxidación por microorganismos

se realizan con la utilización de fosfito, el cual se oxida en la célula a compuestos orgánicos de fosfato. Las bacterias utilizan preferentemente fosfatos en lugar de fosfito (19).

Las reacciones metabólicas como la respiración pueden generar la liberación de protones (H^+) por su translocación a través de las ATPasas, lo que genera una alta concentración de estos cationes en las superficies externas de la célula. De igual manera la asimilación de NH_4^+ por parte de los microorganismos, debido al uso de sales de amonio como fuente de nitrógeno produce una alta concentración de protones. Estos procesos metabólicos causan la acidificación del medio circundante lo que produce liberación de fósforo disponible de una forma similar a la mediada por ácidos orgánicos (29).

Los llamados sideróforos son compuestos quelantes de bajo peso molecular, cuya función es actuar sobre los cationes en forma de ligando. Estos compuestos compiten capturando el ion férrico (Fe^{3+}) a partir de fuentes minerales, formando un nuevo compuesto soluble que puede ser transportado activamente por los organismos. De esta manera, los sideróforos actúan en muchas ocasiones sobre fosfatos de hierro lo que conlleva a la liberación del grupo fosfato, que puede ser asimilado por las plantas. Este mecanismo es una de las estrategias más usadas por los microorganismos presentes en suelos con valor de pH cercano o inferior a 5, en los cuales los fosfatos de hierro pueden ser disociados, lo que causa la liberación de dos elementos esenciales para el crecimiento vegetal. En suelos en condiciones de anaerobiosis los fosfatos de hierro son escindidos por su reacción con el sulfuro de hidrógeno (H_2S) producido por los microorganismos, precipitando sulfuro de hierro y liberando los grupos fosfato (18).

1.4.3.3. *Aislamiento y selección de bacterias*

La microbiología de suelos requiere el conocimiento de técnicas apropiadas para la obtención de los organismos de interés en un estado útil para su estudio. Las primeras etapas de todo estudio microbiológico involucran el aislamiento del o los microorganismos desde su matriz original y su crecimiento en un medio con características físicas y químicas específicas. En un ambiente natural, como lo es el suelo, es frecuente hallar varios tipos de microorganismos formando comunidades, por lo que si se busca el aislamiento y cultivo de ciertas cepas de interés, lo más corriente es el empleo de técnicas de enriquecimiento. Estas requieren que los medios de cultivo y las condiciones de incubación sean selectivos para el organismo que se desea aislar y contraselectivos para la microbiota acompañante (30).

Diversos medios se suscitan como capaces de seleccionar cepas de BSP desde la matriz edáfica, considerando para ello su particular capacidad fisiológica. Según lo publicado en 2010 por Paredes Mendoza (31), los medios más destacados en tal sentido son el agar PVK desarrollado por Pikovskaya en 1948, el agar Sperber (32) y el National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium o NBRIP desarrollado por Nautiyal en 1999 (33), siendo este último uno de los más usados por su eficiencia para seleccionar microorganismos con alta capacidad para solubilizar fuentes de P inorgánico. En cualquier caso, la característica distintiva de todos ellos es que permiten identificar a las cepas solubilizadoras a partir del halo traslúcido que se desarrolla en torno a las colonias correspondientes.

Es sabido que, al trabajar con muestras de suelo, es posible hallar no sólo bacterias sino también hongos solubilizadores de fósforo. Cuando únicamente se desea aislar las primeras lo ideal es adicionar al medio de cultivo cierta dosis de un antimicótico. Una de las sustancias empleadas con éxito para tal fin es la nistatina (34).

Al trabajar por primera vez con microorganismos solubilizadores de fósforo como rasgo de interés, es de gran importancia evaluar comparativamente la eficiencia de las cepas aisladas. Los trabajos desarrollados hasta el momento se preocupan por describir el grado con que las BSP son capaces de producir compuestos solubles de P, los que se presumen útiles para el crecimiento y desarrollo de las plantas (9, 18, 22, 24, 34, 35).

Algunos autores (22, 35) consideraron importante el tamaño de los halos de solubilización formados en torno a cada colonia de interés. Para ello trabajaron mediante el cálculo de un índice de solubilización, el cual consiste en restar al diámetro total, con halo incluido, el diámetro de la colonia y dividir al resultado por este último. Bajo este método, se presume que las cepas con los mayores valores del índice son las más eficientes.

Por otra parte, diversas publicaciones (18, 24, 34, 36, 37) han probado la eficiencia de solubilización de fósforo a partir del cultivo de las bacterias en medio líquido con fosfato tricálcico, realizando mediciones de las ppm de P disponible tras cierto período de incubación.

En el presente trabajo se pretendió reproducir lo realizado por Álvarez Figueroa (38), el cual utilizó los valores de índice de solubilización como una primera aproximación para seleccionar las cepas de BSP más eficientes. Luego, aquellas con los valores más elevados, se sometieron a pruebas de solubilización de fósforo en medio líquido para escoger a las mejores bacterias.

1.4.3.4. *Conservación de cepas*

Una vez seleccionadas las cepas de mayor interés, por su rasgo fisiológico y su eficiencia, es importante conservarlas de forma tal de asegurar la continuidad de los variados estudios que se puedan realizar en torno a ellas. De acuerdo con el tiempo que se desee conservar a los microorganismos se puede hablar de técnicas de corto y largo plazo.

Los métodos de conservación a largo plazo son de gran utilidad para la producción de ceparios capaces de mantener la estabilidad genética y la viabilidad de las células. Bajo esta esfera, la congelación es uno de los métodos más utilizados. Dicho proceso se puede clasificar, de acuerdo a la temperatura a la que se lleva a cabo, como: ordinaria (-5 °C a -20 °C), ultrafría (-50 °C a -80 °C) y congelación con nitrógeno líquido (-150 °C a -196 °C). A los propósitos del presente estudio, se trabajó con el primer tipo, ya que estaba de acuerdo con los recursos disponibles (39).

Es importante destacar que el fenómeno de congelamiento en las células puede llegar a causar lesiones en sus componentes, debido a la formación interna de pequeños cristales de hielo; en respuesta a ello, autores de trabajos anteriores resaltan la necesidad de utilizar sustancias crioprotectoras con bajos puntos de congelación (menores a 0°C) para ralentizar el proceso. Un agente muy utilizado en la crioprotección de células microbianas es el glicerol (39, 40, 41, 42).

Respecto a la metodología específica para el almacenamiento y conservación de las bacterias por congelamiento, la empresa norteamericana Copan Diagnostics Inc. comercializa a nivel mundial un sistema eficaz denominado CRYOBANK™. El mismo se basa en un criovial (tubo plástico con tapa) que contiene perlas cerámicas suspendidas en una solución preservante criogénica con glicerol. Los inóculos son introducidos en el tubo, el cual es agitado para que las bacterias se adhieran a las perlas y sometido a temperaturas de congelamiento. La recuperación de los microorganismos se realiza extrayendo una perla del criovial y depositándola en un medio de cultivo apropiado (sólido o caldo nutritivo) que se incubaba para la reactivación de las células (43). En el presente trabajo se reprodujo esta metodología con materiales alternativos.

1.4.4. Aplicación agronómica de las BSP: biofertilización

Los factores que hacen a la dinámica de los nutrientes en el suelo son variados y los que actualmente reportan mayor interés desde el punto de vista de la sustentabilidad son los biológicos y, en particular, los microbiológicos. Es en este contexto en el que aparece el concepto de biofertilización, que consiste en la aplicación de microorganismos vivos capaces de aumentar el suministro o disponibilidad de nutrientes para las plantas y estimular procesos regenerativos de los suelos (44).

Distintos autores a lo largo de muchos países, han estudiado la capacidad de especies bacterianas con capacidad de movilizar el P insoluble del suelo y transformarlo a formas disponibles para las plantas (9). El potencial de uso de los microorganismos solubilizadores de fósforo como alternativas 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. En Canadá *Penicillium bilaiae* se registró como producto comercial para uso en trigo en 1990, año en el cual sólo se utilizó en unas pocas hectáreas, pero para el 2002 aproximadamente un millón de hectáreas sembradas con los principales cultivos del país utilizaban el biofertilizante bajo la marca JumpStart®. En Cuba, Fosforina® es un bioinoculante a base de *Pseudomonas fluorescens* aplicado principalmente en tomate. Actualmente, en Colombia, se comercializa Fosfosol®, producto de la investigación realizada en la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, 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 (4).

En nuestro país las líneas de investigación en relación al tema han estado orientadas al aprovechamiento de los microorganismos para el manejo agronómico de cultivos de importancia económica, tales como la soja *Glycine max* (24), el maní *Arachis hypogaea* (36, 45), el maíz (46), el trigo (47) o las forrajeras *Lotus tenuis* (48) y *Lolium perenne* (49).

Como se mencionó, en Mendoza, a pesar del conocimiento desarrollado sobre las características físico-químicas del suelo, no existen antecedentes acerca de los factores bióticos que afectan la dinámica del P edáfico, los cuales son cruciales en el establecimiento y desarrollo de los cultivos. Se destacó también la importancia del tomate como un cultivar de gran peso económico y se lo definió como la especie vegetal indicadora en este estudio. Si bien no existen ensayos a escala local, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ha sido presentado en anteriores publicaciones como una especie que responde favorablemente a la inoculación con BSP, demostrando la asociación positiva existente entre este tipo de microorganismos y la rizósfera del vegetal (50, 51, 52).

En este contexto el propósito de este estudio fue desarrollar una investigación capaz de aportar al conocimiento de la microbiología del suelo en la provincia de Mendoza, respecto de las BSP. Esto permitirá su posterior utilización como herramienta de optimización de los recursos en la horticultura regional, promoviendo un uso más racional de fertilizantes fosfatados y apostando a nuevas tecnologías de proceso. De igual modo, se pretende reducir los costos energéticos de la producción y aplicación de fertilizantes y promover la protección del ambiente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización de la zona de estudio

El sitio de estudio comprendió una parcela de la Cátedra de Horticultura de la Facultad de Ciencias Agrarias ubicada en Chacras de Coria, departamento de Luján de Cuyo, Mendoza (Figura 5). Una medición previa en dicha parcela, arrojó un valor de P disponible de $3,35^3$ ppm considerado bajo para la zona. Allí, estudiantes de Ingeniería Agronómica de la facultad llevaron adelante un cultivo de tomate para industria hasta cosecha; las características del manejo agronómico reportadas fueron:

- Incorporación de guano de pollo parrillero a razón de 8 tn/ha, exceptuando las tres últimas hileras del borde sur de la parcela.
- Preparación del terreno mediante arada y rastrillada.
- Armado de camellones de unos 30 cm de altura.
- Incorporación de estimulantes del crecimiento y fungicida, antes del trasplante, exceptuando las plantas a colocar en las tres últimas hileras del borde sur de la parcela. Las plántulas se obtuvieron realizando almácigos en bandejas.
- Plantación en hileras, con una distancia entre plantas de 20 cm.
- Aporque a los 15 días de realizado el trasplante.
- Riego periódico superficial por surcos.
- Manejo fitosanitario y de la fertilidad, según protocolo propuesto por la cátedra de horticultura.

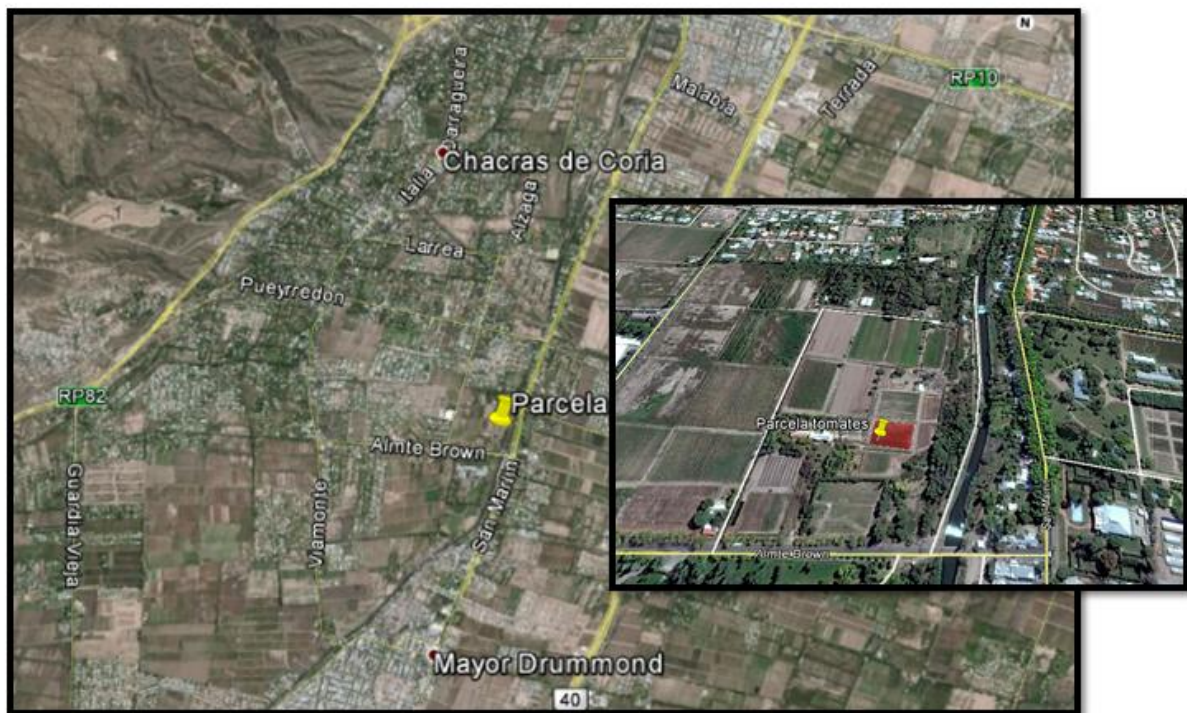


Figura 5: Ubicación geográfica de la parcela en estudio. La misma se halla 150 m al norte de calle Almirante Brown, en la localidad de Chacras de Coria, Luján de Cuyo, Mendoza. Dista además 90 m al oeste del Canal Cacique Guaymallén que pasa por la zona (Vista ampliada, la parcela está coloreada de rojo). Coordenadas: $33^{\circ} 0'14.30''S$; $68^{\circ}52'10.44''O$. Capturas de imagen del software Google Earth.

³El nivel de P disponible fue determinado en la Cátedra de Edafología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo. La técnica empleada fue la de extracción carbónica 1:10, desarrollada por Nijensohn en 1991.

2.2. Muestreo

En el sitio cultivado de la parcela hortícola, se escogieron las tres últimas hileras del lado sur (Figura 6). El muestreo se realizó en la hilera central, quedando una hilera de separación hacia el sur para evitar el efecto del borde. También, una hilera al norte para separar a la central del resto de la parcela, que había recibido guano y tratamiento de plantines pre trasplante.

Se realizó un muestreo aleatorio de las plantas de la hilera seleccionada en tres etapas de su ciclo fenológico: en el trasplante (0 días, diciembre de 2014), una vez iniciada la floración (54 días, enero de 2015) y en un momento previo a cosecha (116 días, marzo de 2015) en el que un 80% de los frutos se encontraba rojo (Figura 7). Para ello se procedió a escoger cinco puntos de extracción de manera sistemática. Cada punto se seleccionó como el espacio comprendido por tres plantas, con el fin de cubrir la mayor extensión posible. De esta forma, cada vez, se obtuvo una muestra compuesta por el suelo de tres plantas consecutivas, homogeneizada mecánicamente.

En cada etapa se tomaron, de igual modo, cinco puntos ubicados en un sitio no cultivado del campo, aledaño a la parcela de cultivo, procurando cubrir la misma extensión que en el caso anterior.

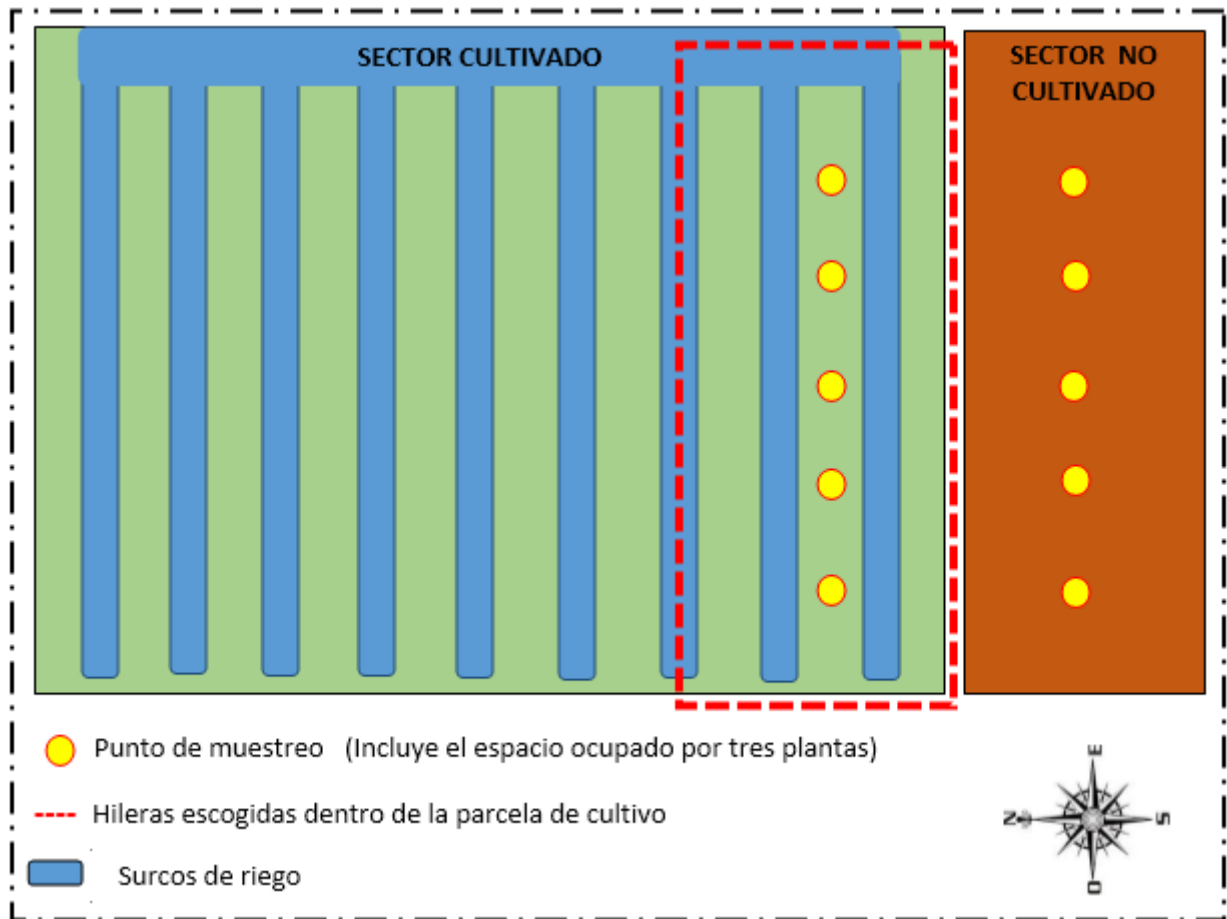


Figura 6: Esquema de muestreo en el campo. El mismo esquema se repitió en cada etapa fenológica considerada.

En la primera etapa del ciclo fenológico se extrajo suelo no rizosférico hasta una profundidad de 20 cm desde la superficie, tanto en el suelo donde se implantó el cultivo como en el campo

inculto; en la segunda y tercera etapa fenológicas se tomó suelo de la rizósfera en el sitio cultivado y suelo no rizosférico del campo inculto.

En todos los casos se empleó un sacabocados de acero inoxidable en forma de T (Figura 8), el cual fue esterilizado entre una muestra y la siguiente. Para ello se embebió un trozo de algodón en alcohol etílico, y se lo frotó por toda la superficie del sacabocados; luego, con la ayuda de un encendedor, se flameó hasta el consumo total del alcohol.

Las muestras de suelo fueron 30 en total, 15 del sitio cultivado y 15 del sitio inculto (5 por etapa, en cada caso). Las mismas se depositaron, de manera aséptica, en receptores plásticos estériles (Figura 9). Se las conservó en refrigerador por no más de 24 horas, hasta efectuar los correspondientes análisis en laboratorio.



Figura 7: Parcela de muestreo en la etapa de maduración de frutos. Al terminar el sitio cultivado, en la franja superior de la fotografía, se observa el sitio inculto.



Figura 8: Hilera de tomate para industria en la etapa de floración. Se observa en el suelo el sacabocados utilizado para extraer las muestras.



Figura 9: Receptor plástico estéril conteniendo una muestra de suelo. Etapa de floración, sitio cultivado.

2.3. Recuentos de bacterias aerobias mesófilas y BSP

Con ayuda de una cuchara estéril se pesó 1 g de cada muestra de suelo para realizar diluciones decimales. Para ello se transfirió a un recipiente con 9 ml de agua destilada estéril y, tras homogeneizar mediante agitación en vórtex, se obtuvo la dilución 1/10 o 10^{-1} . De ésta se tomó una alícuota de 1 ml y se la transfirió a otro tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, se obtuvo entonces la dilución de 1/100 o 10^{-2} . Se procedió de la misma manera hasta llegar a la dilución 1/100 000 o 10^{-5} (Figura 10).

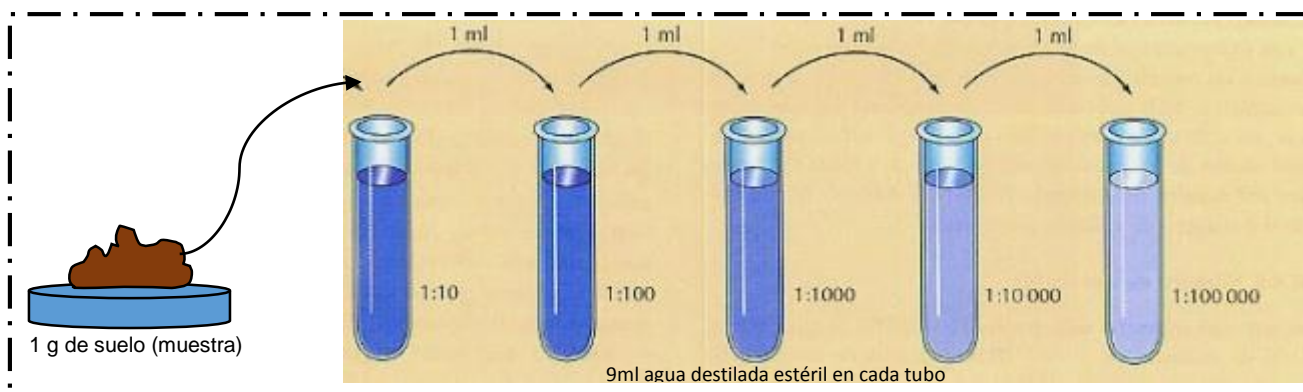


Figura 10: Esquema de diluciones decimales para realizar el recuento de microorganismos en el suelo.

De las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} se tomaron sendas alícuotas de 1 ml para el recuento de bacterias aerobias mesófilas y 0,2 ml para las BSP. Esto se hizo por duplicado.

Para las primeras se utilizó la técnica Pour Plate, empleando 20 ml de medio Agar para Recuento en Placa (Laboratorios Britania S.A.) fundido y estéril, el cual se vertió en placas de Petri y se homogeneizó mediante movimientos circulares. La composición de dicho medio fue: extracto de levadura 2,5 g/L, triptéina 5 g/L, glucosa 1 g/L y agar 15 g/L. Las cajas se llevaron a estufa a 28 °C y se incubaron durante 48 hs.

En el caso de las BSP, el recuento se realizó mediante siembra por agotamiento en superficie (25). Se trabajó en placas de Petri con 20 ml de medio de cultivo NBRIP sólido, adicionado con el antimicótico nistatina. La composición del medio fue: glucosa 10 g, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,5 g, ClNa 0,3 g, ClK 0,3 g, $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g, $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,03 g, Agar 15 g, H_2O 1000 ml, $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ 1 g, Nistatina⁴ 500000 UI cada 200 ml. Las cajas se llevaron a estufa a 28 °C y se incubaron durante 7 días.

Se procedió a contar el número de unidades formadoras de colonias desarrolladas en aquellas cajas que tenían entre 30 y 300. Tanto para bacterias aerobias mesófilas como para BSP se realizaron dos testigos por cada muestreo, en cajas de Petri, como controles de esterilidad del material. Para ello se trabajó con los medios correspondientes y agua destilada estéril en lugar del líquido de diluciones.

Se determinó el contenido hídrico de cada una de las muestras de suelo al momento de la siembra. Para ello se utilizó el método gravimétrico, en el cual se tomó el peso inicial de cada

⁴ Para la obtención de la nistatina se realizó la molienda de un comprimido del medicamento dipni[®], de ESPECIALIDADES MEDICINALES OMEGA, cada 200ml de medio NBRIP. El polvo resultante fue agregado al medio en caliente y disuelto en el mismo por agitación.

muestra de suelo, se las secó luego en estufa a 105°C por 24 horas y se las volvió a pesar (habiendo alcanzado peso constante). El valor final se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$W = ((\text{Peso Bruto Inicial} - \text{Peso Bruto Final}) / (\text{Peso Bruto Final} - \text{Peso tara})) * 100$$

Donde:

W= Contenido hídrico expresado en gramos de agua por cada 100 g de suelo seco (g%g), o porcentaje de humedad (ver *Anexo*).

Finalmente, en cada caso, se calculó el número de bacterias como unidades formadoras de colonias (53):

$$\text{UFC/g s.s.} = (\text{NC} * 1/\text{FD} * 1/\text{V}) / (\text{P} * \text{FH})$$

Donde:

UFC/ g s. s. = unidades formadoras de colonias / g de suelo seco.

NC= número de colonias contadas en la caja seleccionada.

FD = factor de dilución, que corresponde a la dilución en la que se realizó el recuento (10^{-3} , 10^{-4} o 10^{-5}).

V= volumen inoculado en la caja = 0,2 ml para las BSP y 1 ml para las BAM.

P = peso de la muestra húmeda = 1 g.

FH = factor de corrección de humedad ($1 - (\% \text{humedad}/100)$).

2.4. Selección y aislamiento de cepas

Las cajas de Petri sembradas con BSP se emplearon, luego del recuento, para seleccionar a aquellas colonias más sobresalientes. De las seis cajas correspondientes a cada muestra (tres diluciones sembradas por duplicado) se escogieron algunas colonias con halos grandes, hasta un máximo de 5, según tuviesen características culturales diferentes.

Cada colonia seleccionada se aisló para la obtención de un cultivo puro. Para ello se realizaron dos purificaciones mediante siembra por estrías en medio NBRIP (Figura 11). En cada purificación las cajas se incubaron a 28 °C durante 7 días. Todos los aislamientos se registraron, de forma individual, con un número entero y se llevaron a heladera.



Figura 11: Caja de Petri correspondiente a la segunda purificación de una cepa de BSP. Se observa la siembra por estrías y, al trasluz, los halos de solubilización formados en medio NBRIP.

2.5. Tamaño de halos e índice de solubilización

Para determinar la eficiencia de las BSP se calculó su índice de solubilización. Cada aislamiento se reactivó en medio NBRIP líquido: 1 ml de medio se transfirió a tubos de ensayo estériles; con un ansa acodada estéril se raspó ligeramente cada aislamiento en caja y se sumergió luego en el medio líquido; los tubos se incubaron en agitador a 28 °C y 140 rpm por 48 horas.

Las cepas activadas se sembraron en medio NBRIP sólido a razón de 4 por caja; para ello se tomó de cada tubo una alícuota con un ansa en arito y se la depositó sobre la superficie. Las cajas se incubaron a 28 °C por 7 días, tras los cuales se midió el diámetro de las colonias crecidas y del halo formado en torno a cada una; se trabajó para ello con un calibre digital.

Finalmente se calcularon los índices de solubilización mediante la fórmula propuesta por Becerra (35) como $[(\text{diámetro de la colonia} + \text{diámetro del halo})/\text{diámetro de la colonia}]$. Cada diámetro utilizado resultó ser un promedio entre las mediciones del diámetro menor y el diámetro mayor.

2.6. Conservación de cepas

A partir del cultivo activo en medio líquido se sembró en picos de flauta (30) con 5ml de medio NBRIP, en tubos con tapa a rosca. El resto del material activado se destinó a la crioconservación de las cepas.

Se vertió a tal fin en tubos tipo eppendorf estériles de 1,5 ml de capacidad, los cuales contenían 10 canutillos plásticos en su interior (Figura 12). Se adicionaron finalmente 0,2 ml de glicerol estéril en cada tubo, con la ayuda de una pipeta de vidrio, como agente crioprotector. Cada criovial se identificó correctamente y depositó en una caja de cartón, dividida en compartimentos internos (Figura 13), para ser almacenados en freezer a -18° C.

La construcción de este cepario se realizó para permitir la utilización de las BSP en futuras investigaciones, adquiriendo un especial interés los estudios vinculados con la formulación de bioinóculos para ensayos a campo. Cabe resaltar, sin embargo, la necesidad de caracterizar e identificar de manera previa cada una de las cepas de interés, en particular las que reportaron los mayores índices de solubilización.



Figura 12: Tubos eppendorf con canutillos plásticos, destinados al cepario. Cada tubo contiene medio NBRIP líquido con 20 % de glicerol.

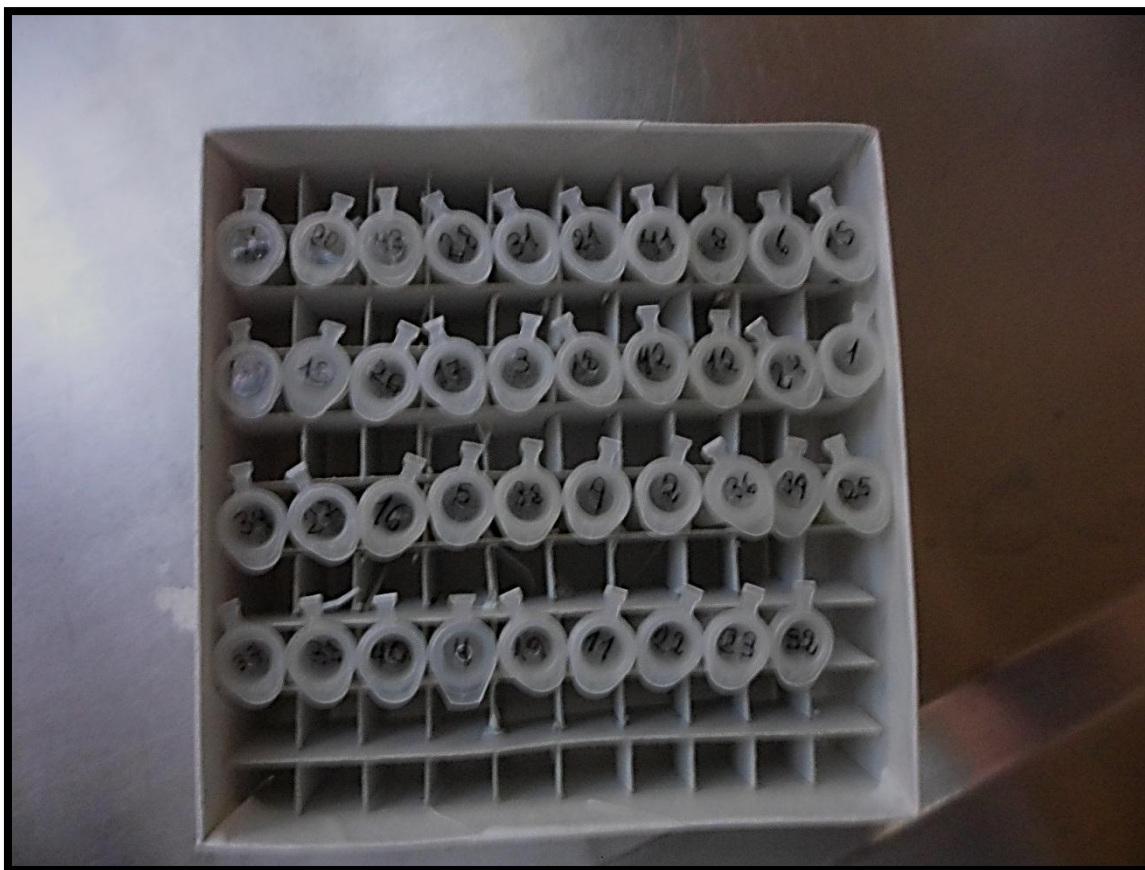


Figura 13: Cepario de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo listo para ser almacenado en freezer.

2.7. Solubilización de P en medio líquido

Del total de cepas de BSP conservadas en freezer, se trabajó solamente con las que presentaron valores de índice de solubilización mayores a 2. Para cada una se tomó un canutillo a partir de los tubos eppendorf almacenados en el cepario y se los activó a 28 °C en caldo nutritivo con peptona, glucosa y extracto de levadura (30). La concentración celular fue correlacionada con la absorbancia del cultivo activo medida a 600 nm.

Tras alcanzar la concentración de 10^9 células por ml para cada cepa, se transfirió una alícuota de 1 ml de la suspensión celular a tubos de ensayo estériles con 15 ml de caldo NBRIP, al tiempo que se hizo lo mismo con 1 ml de medio sin inocular a modo de testigo.

Las cepas y los testigos se incubaron a 28 °C y 140 rpm en agitador. Transcurridos 9 días, se tomó asépticamente 1,5 ml de cada tubo y se lo transfirió a tubos eppendorf, los cuales se centrifugaron a 10.000 rpm durante 12 minutos; se extrajeron 0,5 ml del sobrenadante para medir la concentración de fósforo soluble por espectrofotometría, de acuerdo a la técnica desarrollada por Murphy y Riley en 1962 (13, 45, 54). Los fundamentos de la técnica y el procedimiento analítico se detallan en el Anexo. La siguiente figura muestra una medición de absorbancia en espectrofotómetro, la cual guarda relación con la concentración de P soluble.



Figura 14: Medición de fósforo solubilizado en medio líquido por espectrofotometría. Cada par de matraces corresponde a una cepa bacteriana, la intensidad de color es proporcional a la concentración de fósforo en solución.

2.8. Análisis de los datos

Se comparó estadísticamente, mediante el software Infostat, el número de bacterias aerobias mesófilas y de BSP entre las distintas etapas fenológicas contempladas, así como en los suelos cultivado e inculdo en cada etapa. Se trabajó con un Análisis de la Varianza no Paramétrico, en particular la prueba de Kruskal-Wallis (55), empleada cuando no se cumplen los supuestos de normalidad y/u homoscedasticidad para el Análisis de la Varianza, y luego Comparaciones Múltiples por rangos ($p \leq 0,05$).

Se buscó también hallar la correlación entre el índice de solubilización y las ppm de P disueltas en medio líquido. Se trabajó para ello con la función "Coeficiente de Correlación" del software Infostat versión 2011.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aclaración previa

Al momento de realizar el recuento correspondiente al primer muestreo (momento de trasplante), la sal utilizada como fuente de fósforo en el medio de cultivo NBRIP resultó, por encontrarse su recipiente mal rotulado, no ser un fosfato de calcio insoluble. Por este motivo no fue posible reconocer o contar las colonias de BSP. Se pensó entonces que tales bacterias no estaban presentes en el suelo. Para cuando se reparó en la verdadera causa algunos meses después, las muestras de suelo ya habían sido descartadas.

Al siguiente año en el mismo lugar donde se extrajeron las muestras también se cultivó tomate, por lo que se repitió el muestreo de suelo correspondiente a la etapa trasplante. Los resultados obtenidos no pudieron ser comparados con los de la campaña anterior ya que las condiciones meteorológicas y edáficas fueron particularmente diferentes. Lo que alteró en forma significativa la microbiota del suelo (ver apartado *Caso particular: etapa de trasplante*). Se procedió por lo tanto a considerar la información recabada a partir del segundo y tercer muestreo (etapas fenológicas de floración y maduración del tomate) para realizar los análisis comparativos correspondientes.

3.2. Detección y recuento de BSP y bacterias aerobias mesófilas

De acuerdo con los ensayos realizados en el presente estudio, tanto en floración como en maduración de frutos, fue posible hallar y aislar, del suelo cultivado y no cultivado, bacterias solubilizadoras de fósforo en medio selectivo NBRIP adicionado con nistatina, lo que demuestra su existencia en la zona estudiada (Figura 15). Este resultado sienta un importante precedente para la realización de nuevos estudios en la provincia de Mendoza, donde no se hallan otros reportes de este grupo funcional en los suelos.



Figura 15: Caja de Petri para recuento de BSP. Se puede observar los halos de solubilización en algunas colonias.

Las Tablas 3 y 4 muestran los valores mínimos, máximos y promedio hallados en cada etapa y discriminados para los sitios cultivado y no cultivado. Los conteos completos se muestran en forma de tablas en el *Anexo*. Como se puede observar, la cantidad de bacterias aerobias mesófilas y de BSP en el suelo fluctuó para las muestras de las etapas de floración y maduración.

Tabla 3: Recuento de bacterias aerobias mesófilas (ufc/g suelo seco) para los sitios y etapas estudiados.

Etapas y sitio	Mínimo	Máximo	Promedio
Floración, cultivado	1,92.10 ⁶	1,35.10 ⁷	7,59.10 ⁶
Floración, no cultivado	5,51.10 ⁶	1,57.10 ⁷	1,17.10 ⁷
Maduración, cultivado	1,51.10 ⁷	3,31.10 ⁷	2,02.10 ⁷
Maduración, no cultivado	1,03.10 ⁷	2,36.10 ⁷	1,63.10 ⁷

Tabla 4: Recuento de BSP (ufc/g suelo seco) para los sitios y etapas estudiados.

Etapas y sitio	Mínimo	Máximo	Promedio
Floración, cultivado	1,26.10 ⁵	9,29.10 ⁵	4,45.10 ⁵
Floración, no cultivado	3,09.10 ⁵	1,04.10 ⁶	7,19.10 ⁵
Maduración, cultivado	1,75.10 ⁶	1,60.10 ⁷	4,77.10 ⁶
Maduración, no cultivado	9,53.10 ⁵	4,29.10 ⁶	2,07.10 ⁶

Según lo reportado por otros autores, el número de microorganismos y los géneros presentes en el suelo varían en el tiempo para un mismo sitio. Por ejemplo, en un estudio realizado en la Sabana de Bogotá, Colombia, se trabajó sobre un cultivo experimental de rosa var. Charlotte. En el mismo se demostró la variabilidad que se producía en la dinámica poblacional de hongos y bacterias, entre dos muestras del mismo suelo separadas en el tiempo (27).

Por otro lado, diversas investigaciones alrededor del mundo han obtenido valores disímiles al efectuar los recuentos de BSP. Entre las principales fuentes de variabilidad citan al clima, la presencia de cultivos y su historia, las características físicas y químicas edáficas, el tipo de suelo y el método de enumeración utilizado por cada investigador (24).

En la Figura 16, se indican las modificaciones en el tiempo que sufrió la relación porcentual entre BSP y bacterias aerobias mesófilas para cada sitio. La misma fue mayor en la etapa de maduración respecto de la de floración, y el incremento registrado fue más grande en el suelo cultivado. En dicho sitio, esto sugiere una estimulación del crecimiento de las BSP en el momento de mayor demanda de fósforo por parte del cultivo (Figura 1).

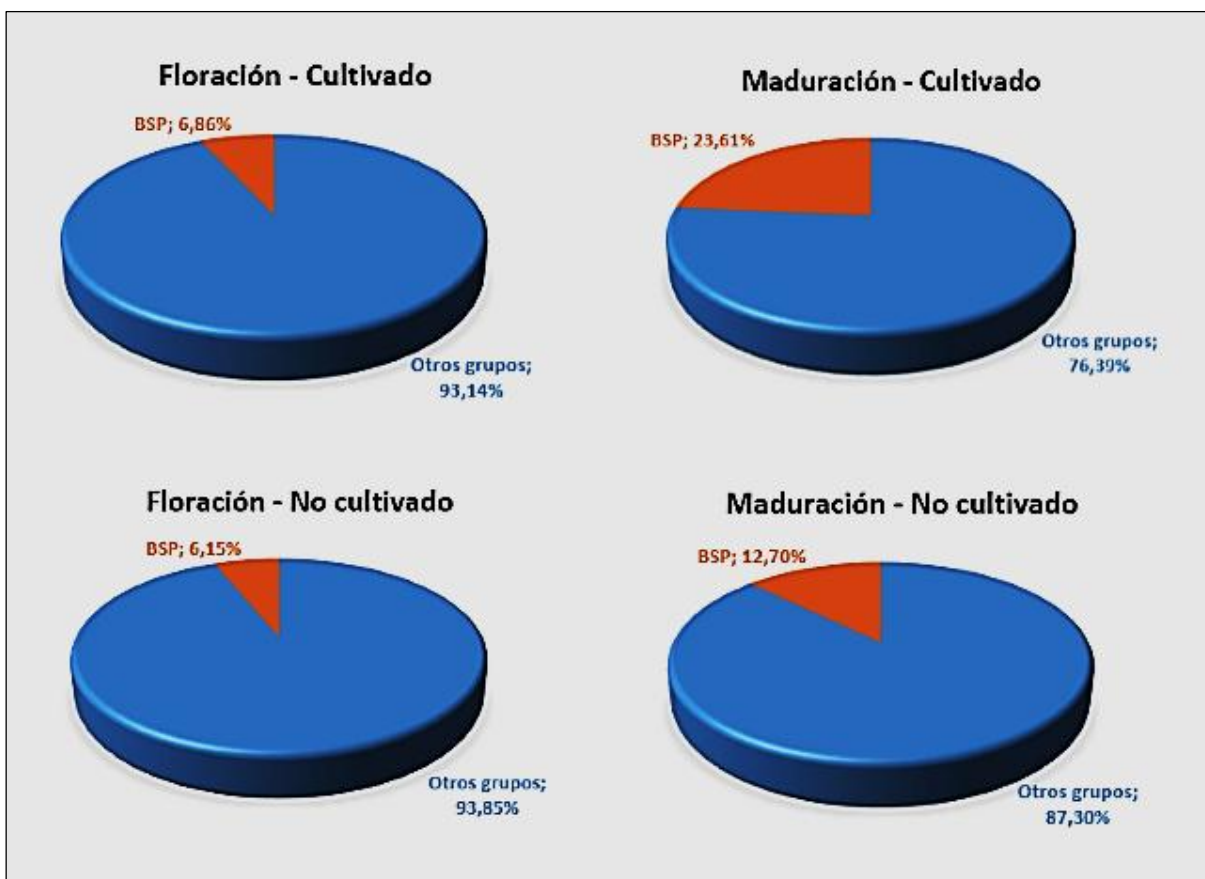


Figura 16: Porcentaje de BSP en cada sitio y momento.

Para el suelo no cultivado, no se esperaba observar cambios en el porcentaje de BSP respecto de bacterias aerobias mesófilas en los diferentes momentos de muestreo. Frente a esto, uno de los factores a tener en cuenta, es el establecimiento de malezas en el sitio inculto. Si bien allí el suelo no fue roturado, abonado ni regado, algunas semillas lograron germinar. Estas especies llegaron a desarrollarse durante la etapa de maduración del tomate y, posiblemente, tuvieron un efecto rizosférico (por liberación de exudados) en el suelo que estimuló la proliferación de BSP. De ser así, dicho efecto fue de menor intensidad que en el sitio inculto, ya que la densidad de plantas, su tamaño y expansión radical fueron menores.

A continuación (Tablas 5 y 6) se presentan los resultados de la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, y la comparación múltiple por rangos ($p \leq 0,05$). La variable "BSP" es el número de bacterias solubilizadoras de fósforo expresado en unidades formadoras de colonia/gramo de suelo seco.

Tabla 5: Análisis de la Varianza no Paramétrico para la variable BSP (ufc/g suelo seco).

Variable	Etapa	Sitio	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
BSP	Floración	Cultivado	5	444800	295779,82	375000	14,54	0,0023
BSP	Floración	No cultivado	5	718000	303335,62	867000		
BSP	Maduración	Cultivado	5	4780000	6277033,54	1920000		
BSP	Maduración	No cultivado	5	2064600	1330793,3	1430000		

Tabla 6: Prueba de comparación múltiple por rangos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Rangos	
Floración/Cultivado	4,4	A
Floración/No cultivado	6,8	A
Maduración/No cultivado	14,2	B
Maduración/Cultivado	16,6	B

Como se puede observar, el análisis mostró diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre las etapas consideradas, siendo mayor el número de ufc/g suelo seco de BSP presentes en el suelo durante la maduración de frutos. Este resultado es coincidente con la mayor demanda de fósforo que tienen las plantas de tomate en dicho momento de su fenología, el cual podría en gran medida ser aportado como resultado del proceso de solubilización llevado a cabo por los microorganismos del suelo.

Por otro lado, los datos no permiten demostrar que exista un mayor número de BSP en el sitio cultivado que en el inculco, en cada etapa considerada, no hallándose diferencias significativas entre ambos. Esto difiere de lo sugerido por la bibliografía consultada. En un artículo de revisión (9), se menciona que la concentración de microorganismos solubilizadores de fósforo es más alta en la rizósfera que en suelo no rizosférico; lo cual es debido a que los exudados radicales y detritus vegetales proporcionan el sustrato energético para que sea posible la actividad microbiológica. Bajo este mismo fundamento, los autores de otro trabajo justificaron la mayor cantidad de hongos y bacterias solubilizadores de fósforo hallados en la rizósfera de plantas colonizadoras, respecto de suelo sin vegetación (56).

Sin embargo, la dinámica poblacional de los microorganismos heterótrofos no está influenciada únicamente por la disponibilidad de compuestos carbonados. Según se aclara en otra publicación, diversos factores como la aireación del medio, el pH, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, las especies presentes en la comunidad microbiológica y las características físico-químicas del suelo han sido también reportados como determinantes de la misma (27). Por otra parte, en ensayos bajo condiciones de manejo contrastante, se ha encontrado en promedio más del doble de recuentos de solubilizadores de fósforo en suelos en situación prístina que en aquellos con una larga historia agrícola (57).

Se dijo previamente que la mayor parte de los microorganismos beneficiosos para las plantas, entre los que se encuentran las BSP, son de tipo aerobio y mesófilo. Esto llevaría a pensar que los resultados anteriores deberían ser coincidentes con los hallados para las bacterias aerobias mesófilas. Se realizó el mismo examen que en el caso previo y los resultados del análisis estadístico se muestran en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7: Análisis de la Varianza no Paramétrico para la variable Bacterias aerobias mesófilas (ufc/g suelo seco).

Variable	Etapas	Sitio	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Bacterias aerobias mesófilas	Floración	Cultivado	5	7602000	4906569,07	9120000	11,06	0,0114
Bacterias aerobias mesófilas	Floración	No cultivado	5	11742000	3891249,16	11700000		
Bacterias aerobias mesófilas	Maduración	Cultivado	5	20220000	7365256,28	17600000	11,06	0,0114
Bacterias aerobias mesófilas	Maduración	No cultivado	5	16320000	5535973,27	15800000		

Tabla 8: Prueba de comparación múltiple por rangos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Rangos		
Floración/Cultivado	4,5	A	
Floración/No cultivado	8,4	A	B
Maduración/No cultivado	13,1		B C
Maduración/Cultivado	16		C

Tal como se observara para las BSP, no se halló diferencias significativas entre los sitios cultivado y no cultivado en cada etapa considerada. Asimismo la mayor cantidad de bacterias aerobias mesófilas se registró durante la etapa de maduración, en coincidencia con lo ocurrido para las BSP.

Otro dato interesante que se desprende de este análisis es que, si bien hubo un incremento de las bacterias aerobias mesófilas en el sitio inculco, este no fue significativo. Por lo tanto se puede pensar que el pool se mantuvo prácticamente constante cuando hubo estabilidad en el manejo de suelo. Lo contrario ocurrió con el suelo que fue trabajado, en el cual en floración se registró una menor población de estas bacterias que en maduración. Aunque el pool de bacterias aerobias mesófilas se mantuvo prácticamente constante en el tiempo en el sitio inculco, se incrementó la proporción de organismos solubilizadores, tal como se dijo previamente (Figura 16). En el suelo cultivado, en maduración, se incrementaron tanto las bacterias aerobias mesófilas como la proporción de solubilizadoras en el tiempo.

Por último, cabe destacar el hecho que las BSP aisladas en este trabajo corresponden a cepas nativas las que, puede esperarse, estarían mejor adaptadas a las condiciones propias de nuestro medio, en comparación a los aislamientos comerciales que podrían emplearse como inóculos. A su vez, algunos estudios demuestran una mejoría en los parámetros asociados al rendimiento de los cultivos inoculados con cepas nativas, respecto de las comerciales.

En tal sentido un grupo de investigadores (36), inoculó plantas de maní con 8 cepas nativas de BSP, utilizando la cepa comercial *Pseudomonas fluorescens* como control. El ensayo se realizó en la provincia de Córdoba, y los resultados indicaron un incremento en los parámetros de crecimiento en las plantas inoculadas con cepas nativas, no así en el caso de la comercial. De igual manera, otros autores (58) obtuvieron mayores valores de peso seco en plantas de maní inoculadas con algunas cepas de BSP nativas, respecto de *Pseudomonas fluorescens*.

3.3. Eficiencia de solubilización de las BSP

3.3.1. Índice de solubilización

Para las pruebas de eficiencia se seleccionaron algunas colonias de las cajas correspondientes a los recuentos. En la Figura 17 se muestran algunas de las cajas sembradas para la medición de los índices de solubilización.

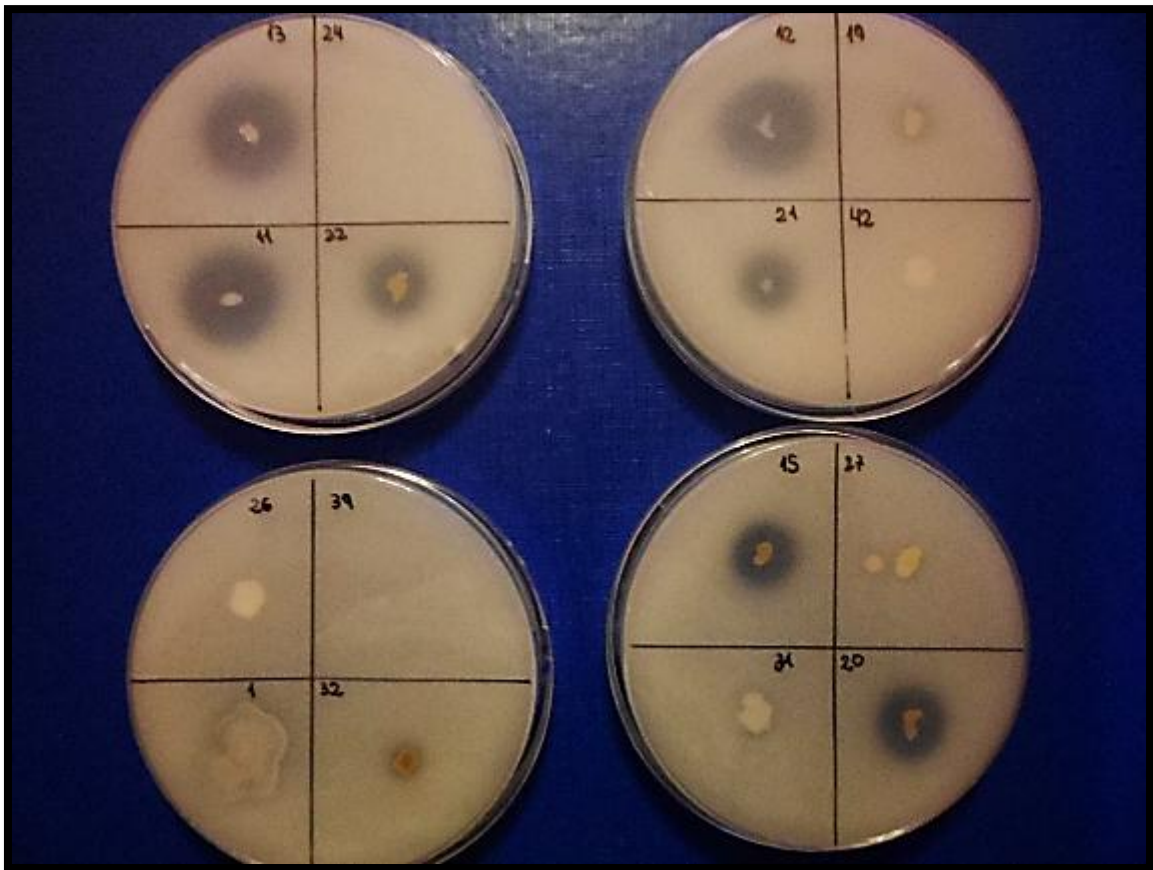


Figura 17: Cajas para medición de halos y cálculo del índice de solubilización. Notar que la siembra fue hecha a razón de 4 cepas por placa.

A partir de las muestras obtenidas en la etapa de floración se logró aislar (tras dos purificaciones en caja) un total de 33 cepas solubilizadoras con halos observables a simple vista, mientras que en la etapa de maduración se obtuvieron 50. A pesar de ello, al realizar el cálculo del índice de solubilización (Tabla 25 del *Anexo*), en ambos momentos fenológicos el número de cepas aisladas que presentaron valores mayores a 2 fue el mismo: 9 cepas en cada momento. En cada caso, 8 cepas correspondieron a muestras de suelo cultivado y sólo una a suelo no cultivado.

En el gráfico presentado a continuación (Figura 18) se observa el número total de cepas solubilizadoras de fósforo aisladas en el presente estudio, clasificado por etapa (floración, maduración) y por sitio de muestreo (cultivado, no cultivado). También se ha discriminado el número de cepas que presentaron los mayores índices de solubilización. Los valores medidos para cada una se detallan en el siguiente apartado, de forma comparativa con la cantidad de P disuelto en medio líquido.

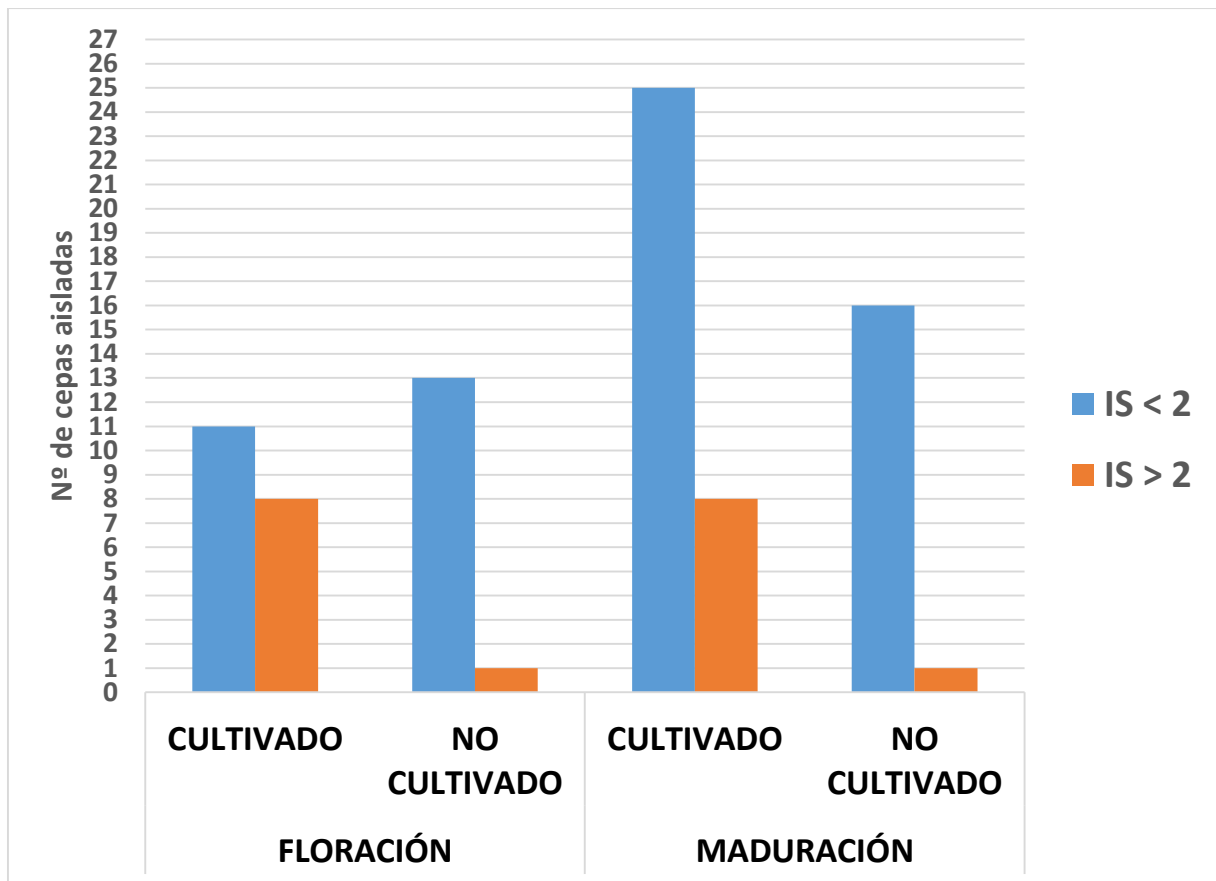


Figura 18: Cantidad de cepas solubilizadoras de fósforo aisladas por etapa y sitio de muestreo, según valor del índice de solubilización (IS).

La mayor parte de las cepas que reportaron índices de solubilización elevados -88,89%- se aisló del sitio cultivado de la parcela de muestreo. Esto se puede atribuir a que las BSP resultan más eficaces fisiológicamente cuando están provistas de una mayor cantidad de fuentes de energía. Una mayor concentración de compuestos energéticos en el suelo se encuentra en la rizósfera de las plantas. La liberación de materiales carbonados, por parte de los vegetales, en forma de exudados radicales estimula las actividades fisiológicas de los microorganismos del suelo, tal como lo aseguran en sus trabajos Beltrán Pineda et al. (9) y Oliveros-Bastidas et al. (26).

3.3.2. P solubilizado en medio líquido

El total de las 83 cepas bacterianas obtenidas en las etapas de floración y maduración se conservó en medio NBRIP con glicerol en freezer, constituyendo un cepario. Sin embargo, sólo las 18 cepas que presentaron los mayores valores de índice de solubilización se sometieron a prueba en medio líquido, para conocer su eficiencia cuantitativa para la disolución de fosfato tricálcico.

Los resultados alcanzados para la cuantificación del P solubilizado en medio líquido son variables (CV = 96,18) y coinciden con los medidos en algunas cepas aisladas de cultivos de importancia económica (ver Tabla 2). La cantidad de P disuelto se indica en la Tabla 9, y el cálculo completo se muestra en el Anexo. Los datos presentados incluyen la identificación numérica de cada cepa en cuestión, el sitio de la parcela de muestreo de donde se obtuvieron y el valor correspondiente de índice de solubilización. Las BSP que presentaron mayor eficiencia cuantitativa están resaltadas con color verde.

Tabla 9: Cepas con capacidad de solubilización de fósforo sobresaliente.

Cepa	Etapa y sitio de obtención	Fósforo disuelto (ppm)	Índice de solubilización
8	Floración/cultivado	3,08	3,21
11	Floración/cultivado	44,56	4,98
12	Floración/cultivado	59,77	4,13
13	Floración/cultivado	76,71	4,78
15	Floración/cultivado	6,94	3,43
20	Floración/cultivado	16,55	3,19
21	Floración/cultivado	159,42	3,09
22	Floración/cultivado	210,68	2,59
29	Floración/no cultivado	-1,39	2,54
44	Maduración/cultivado	186,81	2,91
48	Maduración/cultivado	61,64	2,05
50	Maduración/cultivado	11,62	2,52
51	Maduración/cultivado	83,10	2,22
59	Maduración/cultivado	54,42	3,02
60	Maduración/cultivado	32,32	2,57
69	Maduración/cultivado	44,32	2,02
70	Maduración/cultivado	53,74	2,38
83	Maduración/no cultivado	49,85	2,77

Al evaluar la correlación entre el índice de solubilización y las ppm de P disueltas en medio líquido (Figura 19), los datos obtenidos demostraron que no hubo tal correlación, ya que el valor de p fue superior a 0,05 e igual a 0,84. La bibliografía revela que hay casos en los que no se halla correspondencia entre los resultados obtenidos en las pruebas de medio líquido y las efectuadas en medio sólido. Álvarez Figueroa y García Bendezú (38) aislaron 20 microorganismos solubilizadores de fosfatos de suelos calcáreos de Perú. Cuatro de ellos se seleccionaron por su eficacia, medida a partir del cálculo de su índice de solubilización. La cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. fue la que presentó el valor más alto, seguida por *Clostridium* sp. y el hongo *Penicillium* sp. Posteriormente se realizó, para cada microorganismo, una prueba de solubilización en medio líquido. Los autores hallaron que la mayor cantidad de fósforo disuelto (en partes por millón) lo obtuvo *Clostridium* sp., mientras que *Pseudomonas* sp. y *Penicillium* sp. alcanzaron valores mucho más bajos.

Sin embargo, según lo anunciado por Patiño Torres (4), distintos autores coinciden en que la técnica de agar en placa y medición de halos es un método adecuado cuando se pretende aislar y caracterizar un elevado número de cepas con capacidad de solubilización. De cualquier manera, la verdadera funcionalidad de las cepas se conoce al realizar ensayos que reproduzcan las condiciones naturales, o bien, sean realizados a campo.

Coeficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	Fósforo disuelto (ppm)	IS
Fósforo disuelto (ppm)	1,00	0,84
IS	-0,05	1,00

Figura 19: Análisis de la Correlación entre las variables fósforo disuelto en medio líquido (ppm) e índice de solubilización (IS). Salida del software estadístico Infostat.

Según la Tabla 9, tres cepas presentaron una capacidad sobresaliente para solubilizar fósforo inorgánico en medio líquido. Las cepas 21 y 22 se aislaron a partir de muestras de suelo cultivado durante la etapa de floración, mientras que la cepa 44 se aisló de suelo cultivado en la etapa de maduración de frutos. Los tres aislamientos son de gran interés para la realización de investigaciones futuras sobre formulación de inóculos y biofertilización de plantas.

Cabe mencionar que existen bacterias que poseen una mayor actividad solubilizadora como las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium*, que son reconocidas como sobresalientes en comparación con otras (18). Por lo tanto, resulta imperativo realizar la identificación específica de los aislados de mayor interés en próximos ensayos.

Numerosas publicaciones hablan de la inoculación de plantas con BSP para mejorar su rendimiento agronómico y, al mismo tiempo, evitar la sobre fertilización química. Lara et al. (37) inocularon semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.) con cepas nativas de *Klebsiella* sp. y *Enterobacter* sp. aisladas de suelos de Sucre, Colombia; las plantas inoculadas evidenciaron un mayor crecimiento y desarrollo en comparación con los testigos, lo que confirmó el efecto positivo de la actividad solubilizadora de fosfato. Por su parte Sánchez López (52) inoculó plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), en condiciones de invernadero, con bacterias solubilizadoras de P; halló que algunas cepas de *Enterobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. incrementaron de manera notoria la biomasa de las plantas así como el rendimiento en la producción de frutos. Plazas Ariza (59) consiguió optimizar la formulación del medio y las condiciones de cultivo de la cepa *Enterobacter agglomerans*, la cual presentaba potencial para ser empleada como biofertilizante; en dicho ensayo logró reducir los costos asociados. Finalmente, Patiño Torres (4) inoculó plantas de ají (*Capsicum annum*) con las cepas *Burkholderia ambifaria* y *Burkholderia lata*, nativas de suelos del Valle del Cauca, Colombia; la bioinoculación permitió disminuir la cantidad de fertilizante químico, a la mitad de la dosis aplicada, sin que el crecimiento de las plantas se afectara.

3.4. Caso particular: etapa de trasplante

Como se mencionó, el muestreo correspondiente a la primera etapa fenológica considerada debió ser repetido al año siguiente. La toma de muestras fue semejante a los casos ya presentados. Cabe recordar que la parcela en estudio se reimplantó con tomate para industria (*Solanum lycopersicum* L.), lo que resultó favorable para la realización del nuevo ensayo. Todos los análisis de laboratorio correspondientes se practicaron sobre las muestras de suelo obtenidas.

En trasplante, tal como ocurriera en floración y maduración de frutos, se encontraron BSP en el suelo. Las mismas se hallaban presentes y en una cantidad superior a la detectada en floración (campaña anterior). De acuerdo a los requerimientos de fósforo del cultivo (Figura 1) y los valores de las etapas ya analizadas se habría esperado que, en trasplante, el número de BSP hubiera sido inferior al de floración y maduración, cosa que no ocurrió. Las siguientes tablas muestran los recuentos mínimo, máximo y promedio de bacterias aerobias mesófilas y BSP.

Tabla 10: Recuento de bacterias aerobias mesófilas (ufc/g suelo seco) para los sitios cultivado y no cultivado en el trasplante.

Etapas y sitio	Mínimo	Máximo	Promedio
Trasplante, cultivado	1,80E+06	1,63E+07	1,03E+07
Trasplante, no cultivado	1,01E+07	1,86E+07	1,35E+07

Tabla 11: Recuento de BSP (ufc/g suelo seco) para los sitios cultivado y no cultivado en el trasplante.

Etapas y sitio	Mínimo	Máximo	Promedio
Trasplante, cultivado	1,34E+06	3,75E+06	2,26E+06
Trasplante, no cultivado	1,37E+06	2,90E+06	2,08E+06

Se analizó la posibilidad que algunos parámetros físicos relacionados con el estado del tiempo hubiesen influido en los resultados (60). Para ello se comparó la evolución de las mediciones registradas¹¹ de temperatura media y precipitación acumulada, considerando los tres meses previos a cada muestreo (Tabla 12). Para floración, se estudió desde octubre de 2014 a enero de 2015; para el nuevo muestreo de trasplante, se analizó desde septiembre a diciembre de 2015.

Los datos meteorológicos indicaron que la temporada previa al muestreo de floración, y el mes propio del muestreo, fueron más cálidos que para el caso particular del trasplante. Dicho parámetro, del cual depende la temperatura del suelo, no habría sido el determinante, siendo que el crecimiento microbiano se ve estimulado a mayor temperatura.

Respecto de las precipitaciones, los registros se comportaron de manera inversa. Los milímetros de agua acumulados fueron más en el período considerado hasta trasplante que en el tomado hasta floración. Esto podría explicar, en parte, los recuentos obtenidos, ya que se sabe que el crecimiento microbiano responde positivamente a mayores valores de humedad.

Tabla 12: Marcha de temperaturas medias y precipitación acumulada en los meses previos hasta los muestreos de floración y el caso particular del trasplante.

Fecha	Precipitación acumulada (mm)	Temperatura (°C)
oct-14	7,1	20,4
nov-14	10	21,3
dic-14	77,6	23,8
ene-15	14,8	26
Sumatoria	109,5	91,5
sep-15	7	13,3
oct-15	49,3	12,9
nov-15	104,3	18,9
dic-15	42,1	24,3
Sumatoria	202,7	69,4

Las diferencias observadas, sin embargo, pudieron deberse mayormente a que en el cultivo de la nueva temporada toda la parcela había recibido guano de base. Esta enmienda orgánica pudo haber estimulado la actividad microbiológica del suelo favoreciendo un aumento en el tamaño poblacional de los organismos, los cuales disponían de mayor cantidad de nutrientes para crecer. A su vez, el guano posee una considerable carga microbiana, la cual es inherente a este tipo de abonos, y que pudo haber causado el aumento de las cepas y poblaciones de microorganismos en el suelo.

El análisis estadístico de las variables Bacterias aerobias mesófilas y BSP (ufc/g suelo seco) tampoco arrojó diferencias entre los sitios cultivado y no cultivado para la etapa de trasplante ($p \leq 0,05$). Los resultados obtenidos mediante el software Infostat se muestran a continuación.

Tabla 13: Análisis de la Varianza no Paramétrico para la variable BSP (ufc/g suelo seco).

Variable	Etapas	Sitio	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
BSP	Trasplante	Cultivado	5	2256000	903731,15	2080000	0,01	>0,9999
BSP	Trasplante	No cultivado	5	2078000	569347,1	2020000		

Tabla 14: Análisis de la Varianza no Paramétrico para la variable Bacterias aerobias mesófilas (ufc/g suelo seco).

Variable	Etapas	Sitio	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Bacterias aerobias mesófilas	Trasplante	Cultivado	5	10294000	5985430,64	9110000	0,88	0,3968
Bacterias aerobias mesófilas	Trasplante	No cultivado	5	13500000	3400000	11800000		

Respecto de la eficiencia de solubilización, 50 cepas con capacidad solubilizadora de fosfato de calcio se seleccionaron, se aislaron en cultivos puros y se conservaron en freezer a partir de las muestras de suelo de la etapa de trasplante. De las mismas solamente una, identificada con el número 94, mostró un índice de solubilización elevado e igual a **2,04**. Su capacidad fisiológica se midió en medio líquido, y el valor alcanzado de fósforo disuelto fue de **65,76 ppm**. La cepa se obtuvo de suelo no rizosférico en el sitio implantado con tomate (las plántulas eran pequeñas y con un sistema radical no extendido).

4. CONCLUSIONES

Se comprobó la existencia de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo nativas en el suelo analizado, tanto cultivado como no cultivado. La cantidad de BSP fue variable en el tiempo, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los momentos analizados. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de BSP del suelo cultivado con tomate para industria y la cantidad hallada en el terreno inculdo en ninguno de los momentos fenológicos considerados.

El 89,5% de las cepas que presentaron los mayores índices de solubilización se aislaron de suelo cultivado con tomate. El resto provino de suelo no cultivado.

Las técnicas combinadas de reconocimiento por halo y pruebas de eficiencia, mediante cálculo del índice de solubilización en medio sólido y fósforo disuelto en medio líquido, permitieron aislar tres cepas de BSP con una capacidad sobresaliente respecto de las demás para solubilizar fosfato de calcio. Las tres cepas corresponden a aislamientos de suelo cultivado, dos en la etapa de floración y una en maduración de frutos.

Fue posible establecer un cepario de BSP mediante su conservación a largo plazo por congelación ordinaria. Se utilizó tratamiento con glicerol y almacenamiento en freezer en medio NBRIP.

5. FUTURAS INVESTIGACIONES

Se sugiere repetir los ensayos para otros suelos de la provincia de Mendoza: cultivados con otras especies de importancia económica y en terrenos con vegetación nativa. También se recomienda realizar nuevos recuentos para conocer la variabilidad en función de otros factores, tales como la temperatura del suelo y su humedad, el contenido de materia orgánica, la dosis de aplicación de fertilizantes y el contenido de P edáfico. Para la determinación de P solubilizado en medio líquido se aconseja emplear alternativamente otras soluciones colorimétricas, como el reactivo vanado-molibdico, para comparar los resultados con los obtenidos en el presente estudio.

Respecto de futuros estudios sobre biofertilización, cabría inocular plantas de tomate en ensayos de invernadero y pruebas a campo, evaluando su efecto sobre los caracteres asociados al crecimiento y rendimiento del cultivo. Se recomienda proseguir con la caracterización e identificación específica de las tres cepas con capacidad sobresaliente para solubilizar fosfato de calcio.

Por otro lado, se sugiere evaluar estadísticamente la eficacia del medio de cultivo utilizado en la conservación. Para ello se podría someter a pruebas de reactivación el total de las cepas almacenadas.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. MORALES ZEPEDA, F. 2007. El impacto de la Biotecnología en la Formación de Redes Institucionales en el Sector Hortofrutícola de Sinaloa, México. Cap. IV: De la Revolución Verde a la Biotecnología Vegetal [en línea] Tesis para acceder al Doctorado en Planificación Territorial y Desarrollo Regional. Departamento de Geografía Física y Análisis Geográfico Regional, Universidad de Barcelona, http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/41969/6/05.FMS_CAPITULO_IV.pdf, [Consulta: 6 de octubre de 2016].
2. MORENO FRANCO, D. P. et al. 2010. Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia. [en línea] Publicación realizada en revista ContactoS, 78, 25-33 (2010), <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n78ne/eutrofia2.pdf>, [Consulta: 7 de septiembre de 2016].
3. ABBONA, E. A. y SARANDÓN, S. J. 2014. Cap. 8: Manejo de nutrientes en los agroecosistemas. En SARANDÓN, S. J. y FLORES, C. C. Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de Agroecosistemas sustentables. Ed. De la Universidad de La Plata.
4. PATIÑO TORRES, C. O. 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de Biodiversidad y Eficiencia. [en línea]. Trabajo de tesis como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias Agropecuarias Línea de Investigación Manejo de Suelos y Aguas, Universidad Nacional de Colombia, <http://www.bdigital.unal.edu.co/3639/1/9175001.2010.pdf>, [Consulta: 22 de julio de 2016].
5. CERÓN RINCÓN, L. E. y ARISTIZÁBAL GUTIÉRREZ, F. A. 2012. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. Revista Colombiana de Biotecnología, Vol. XIV, No. 1, 285-295. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/32889/32937>, [Consulta: 12 de marzo de 2015].
6. LORENZO M. G., ARGERICH, C. A., POGGI, L. M., y LIPINSKY V. Evaluación de un fertilizante líquido fosfatado (11-30-0+5S) sobre el rendimiento del cultivo de tomate para industria. En avances de manejo en la fertilización líquida de tomate para industria. Asociación Tomate 2000, Informes de progresos 2005-2006 p 100-106.
7. SQM S.A. 2006. CropKit- Guía de Manejo Nutricional de Tomate. [en línea], http://www.sqm.com/Portals/0/pdf/cropKits/SQM-Crop_Kit_Tomato_L-ES.pdf, [Consulta: 18 de julio de 2016].
8. ELLIOT, T. E. y COLE, C. V. 1989. A perspective on Agroecosystem Science. Ecology Vol. 70, No. 6.
9. BELTRÁN PINEDA, M. E. 2014. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Artículo de revisión de la Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria, Vol. 15, No. 1, 101-113. Disponible en: http://www.corpoica.org.co/sitioWeb/Archivos/Revista/Articulo9_REVISTACORPOICA_Vol15No1-2014.pdf, [Consulta: 12 de marzo de 2015].
10. SARANDÓN, S. J. 2014. Cap. 1: La insustentabilidad del modelo de agricultura actual. En SARANDÓN, S. J. y FLORES, C. C. Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de Agroecosistemas sustentables. Ed. De la Universidad de La Plata.
11. DROVANDI, A. et al. 2005. Diagnóstico Preliminar del Estado Trófico del Embalse El Carrizal Provincia de Mendoza. [en línea] Trabajo presentado en el IV Taller Internacional sobre Enfoques Regionales para el Desarrollo y la Gestión de Embalses en la Cuenca del Planta, Salto Grande, Argentina-Uruguay, <http://www.ina.gov.ar/pdf/Cirsa-Limnologia-12%20EL%20CARRIZAL.pdf>, [Consulta: 7 de septiembre de 2016].
12. MORÁBITO J. et al. 2014. Calidad del agua de riego de los ríos Mendoza y Tunuyán superior. Tendencias y recomendaciones. [en línea], <http://www.ina.gov.ar/ifrh-2014/Eje2/2.18.pdf>, [Consulta: 7 de septiembre de 2016].
13. GRÖNROSS, J. et al. 2006. Energy use in conventional and organic milk and rye bread

- production in Finland. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 117, pp. 109-118.
14. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2015. *Agricultura Sostenible*. [en línea] Publicación realizada en el marco de la Agenda de Desarrollo Post-2015 y los Objetivos de Desarrollo del Milenio, <http://www.fao.org/post-2015-mdg/14-themes/sustainable-agriculture/es/>, [Consulta: 12 de marzo de 2015].
 15. SEGURA, M. L. et al. 2000. Fertilización y riego bajo invernadero en producción integrada. *Revista Horticultura*. Horticultura. Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros, ISSN 1132-2950, págs. 16-24. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort%2FHort_2000_146_16_24.pdf, [Consulta: 12 de marzo de 2015].
 16. REBOLLO, M.; PRIETO, T.; BRERO, V. 2005. Aproximación a la historia y epistemología del concepto de suelo: implicaciones didácticas. [en línea], http://ddd.uab.cat/pub/edlc/edlc_a2005nEXTRA/edlc_a2005nEXTRAp75aprhis.pdf, [Consulta: 15 de marzo de 2015].
 17. TYLER MILLER, G. 2009. *Ciencia Ambiental. Desarrollo-sostenible. Un enfoque integral (4ªEd.)*. Cengage Learning. México.
 18. CABALLERO ÁLVAREZ, T. L. Y RUSINQUE, M. C. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato a partir de suelos algodoneros, departamento de Cesar y Meta. Proyecto de Trabajo de Grado de la Carrera de Microbiología Industrial de la Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C.
 19. SMITH S.E. y F.A. SMITH. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystems scales. *Annual Review of Plant Botany*, 62: 227 – 250
 20. PÉREZ VALENZUELA, B. R. 1999. *Edafología en la Agricultura Regadía Cuyana*. Ed. Fundar. 205 p.
 21. NIJENSOHN, L. et al. 1972. Empleo de soluciones bicarbonatadas sódicas en el diagnóstico del nivel de Fósforo disponible en los suelos mendocinos de riego. *Rev. Facultad de Ciencias Agrarias: XVIII (2): 119-126*. Universidad Nacional de Cuyo-Mendoza.
 22. GUZMAN ESTRADA, E. A. 2011. Aislamiento y Caracterización de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo a partir de cuatro suelos de la Provincia de Chimborazo. [en línea] Tesis para la obtención del título de Ingeniería Agronómica por la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador, <http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/1827/1/13T0728%20ESTEBAN%20GUAZM%C3%81N.pdf>, [Consulta: 12 de marzo de 2015].
 23. GARCÍA HUAMÁN, F. T. 2011. *Microbiología del suelo*. [en línea], http://www.florgarcia.com/wp-content/uploads/2011/11/MICROBIOLOGIA_DEL_SUELO.pdf, [Consulta: 13 de julio de 2016].
 24. FERNÁNDEZ, L. A.; ZALBA, P.; GÓMEZ, N. A.; SAGARDOY, M. A. 2005. Bacterias Solubilizadoras de Fosfato Inorgánico aisladas de Suelos de la Región Sojera. [en línea] Publicación realizada por el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-20672005000100004, [Consulta: 12 de marzo de 2015].
 25. GLICK, B. R. 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica, Volume 2012, Article ID 963401, 15 pages. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>, [Consulta: 12 de marzo de 2015].
 26. OLIVEROS-BASTIDAS, Alberto de J. et al. 2009. Exudados de la Raíz y su Relevancia Actual en las Interacciones Alelopáticas. *Revista Química Nova*, Vol. 32, No. 1, 198-213. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000100035, [Consulta: 12 de marzo de 2015].
 27. ALFONSO, M. et al. 2008. Aproximación de la dinámica poblacional de los microorganismos en diferentes sustratos empleados en el cultivo de rosa (*Rosa* spp. var. Charlotte) en la Sabana de Bogotá. [en línea], publicado en *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas-Vol. 2-No. 1-pp. 98-109*.

- <http://www.soccolhort.com/revista/pdf/magazin/Vol2/vol.2%20no.1/Vol.2.No.1.Art.9.pdf>, [Consulta: 18 de julio de 2016].
28. RESTREPO-FRANCO, G. M. et al. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. [en línea]. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 46, No. 1, pp. 63-76. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/119061/1/Bacterias-solubilizadoras-de-fosfato-y-sus-potencialidades-de-uso-Baldani.pdf>, [Consulta: 25 de julio de 2016].
 29. PRADA SALCEDO, L. D. 2013. Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los Andes Orientales colombianos. [en línea] Trabajo de investigación para acceder al título de Magister en Ciencias-Microbiología por la Universidad Nacional de Colombia, <http://www.bdigital.unal.edu.co/10706/1/luisdanielpradasalcedo.2013.pdf>, [Consulta: 4 de julio de 2016].
 30. MADIGAN, M.; MARTINKO, J. y PARKER, J. 2003. Brock Biología de los Microorganismos (10ma Ed). Pearson Educación. Madrid. España. 1096p
 31. PAREDES MENDOZA, M. 2010. Aislamiento y caracterización bioquímica de metabolitos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato. [en línea] Tesis para acceder al título de Doctora en Ciencias por el Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas de Montecillo, Texcoco, Mexico, http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/10521/245/1/Paredes_Mendoza_M_DC_Edafologia_2010.pdf, [Consulta: 6 de julio de 2016].
 32. SPERBER, J. 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian J Agricul Res 9 (6), pp. 782-787.
 33. NAUTIYAL, C. S. 1999. An efficient microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing microorganisms. [en línea], <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x/epdf>, [Consulta: 6 de julio de 2016].
 34. AIPOVA, R. et al. 2010. Assessment of biotechnological potential of phosphate solubilizing bacteria isolated from soils of Southern Kazakhstan. Revista Natural Science Vol.2, No.8, 841-845. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4236/ns.2010.28105>, [Consulta: 12 de marzo de 2015].
 35. BECERRA, J. M. et al. 2011. Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, Vol. 5, No. 2, 195-208. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v5n2/v5n2a04>, [Consulta: 12 de marzo de 2015].
 36. ANZUAY, M.S.; ANGELINI, J.G.; LUDUEÑA, L.; FABRA, A.; TAURIAN, T. 2013. Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el crecimiento de plantas de maní en ensayos en microcosmo. En: XXVIII Jornada Nacional de Maní, General Cabrera, Córdoba. INTA General Cabrera - CIA, Córdoba, p. 64,65. Disponible en: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_efecto_de_la_inoculacin_de_bacterias_solubilizad.pdf ,[Consulta: 31 de agosto de 2016].
 37. LARA, C. et al. 2013. Impacto de bacterias nativas solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). [en línea] Publicación en revista científica Biotecnología Aplicada, 2013; vol. 30, No. 4, <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2013/30/4/BA003004OL271-275.pdf>, [Consulta: 6 de julio de 2016].
 38. ÁLVAREZ FIGUEROA, P. y GARCÍA BENDEZÚ, S. 2012. Selección y Evaluación de Microorganismos Solubilizadores de Fosfatos en suelos calcáreos del Valle del Mantaro. [en línea], [http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/260/1/T-SENESCYT-0029\(1\).pdf](http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/260/1/T-SENESCYT-0029(1).pdf), [Consulta: 6 de julio de 2016].
 39. HERNÁNDEZ SERNA, D. y LOAIZA CANO, A. S. 2014. Selección de un método para la conservación y preservación de actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. [en línea] Anteproyecto de Trabajo de Grado para acceder al título de Tecnólogo Químico por la Universidad Tecnológica de

- Pereira, Colombia,
<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/4316/57192H557.pdf;jsessionid=D3C514E8C4022C54AD0E286D13149625?sequence=1>, [Consulta: 6 de julio de 2016].
40. BOBADILLA HENAO, C. y RINCÓN VANEGAS, S. C. 2008. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. [en línea]. Trabajo de grado para optar al título de Microbiólogo Industrial por la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis130.pdf>, [Consulta: 6 de julio de 2016].
 41. SANCHEZ LEAL, L. C. et al. 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. [en línea], http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTORIG2_4.pdf, [Consulta: 6 de julio de 2016].
 42. ZAMORA RODRÍGUEZ, L. M. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. [en línea] Tesis Doctoral por la Universidad de Girona, <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/7925/Tl3r.pdf?sequence=1> [Consulta: 25 de junio de 2016].
 43. COPAN DIAGNOSTICS INC. CRYOBANK™- Convenient bead system for storing and retrieving bacterial cultures. [en línea], <http://www.copanusa.com/files/4414/2418/5736/CryoBank.pdf>, [Consulta: 17 de julio de 2016].
 44. ADRIANO ANAYA, M. de L. et al. 2011. Biofertilización de café orgánico en etapa de vivero en Chiapas, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, Vol. 2, No. 3. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342011000300009&script=sci_arttext, [Consulta: 12 de marzo de 2015].
 45. TAURIAN, T. et al. 2012. Effects of single and co-inoculation with native phosphate solubilising strain *Pantoea* sp J49 and the symbiotic nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144 on peanut (*Arachis hypogaea* L.) growth. SYMBIOSIS, vol. 57, no. 3, 2012.
 46. GARCÍA, R. A. et al. 2015. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). Rev. Agron. Noroeste Argent. (2015) 35 (1): 19-28.
 47. CRACOGNA, N. F. et al. 2003. Utilización de *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fósforo en el cultivo de trigo. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2003. Resumen: A-045.
 48. CASTAGNO, L.N., ESTRELLA M. J.; SANNAZZARO, A. I.; GRASSANO, A. E. y RUIZ, O. A. 2011. Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). [en línea], Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2011.04968.x/pdf>, [Consulta: 7 de mayo de 2015].
 49. OVIEDO, Mirian E. e IGLESIAS, María C. 2005. Utilización de Bacterias solubilizadoras de fósforo en cultivo de raygrás. [en línea], <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/5-Agrarias/A-053.pdf>, [Consulta: 7 de mayo de 2015].
 50. MENA-VIOLANTE, H. G. y OLALDE-PORTUGAL, V. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. Scientia Horticulturae 113 (2007) 103-106.
 51. MENA-VIOLANTE, H. G. et al. 2009. Fruit texture related changes and enhanced shelf-life through tomato root inoculation with *Bacillus subtilis* BEB-13BS. Agrociencia 43: 559-567 (2009).
 52. SÁNCHEZ LÓPEZ, D. B. 2011. Efecto de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el cultivo de tomate (*Solanum Lycopersicum* var. *Sofía*) bajo invernadero. Trabajo para acceder al Máster en Ciencias Biológicas por la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

53. INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. [en línea], <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/509.pdf>, [Consulta: 13 de julio de 2016].
54. MURPHY J. y RILEY J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27: 31-36
55. HERNÁNDEZ-LEAL, T. I. et al. 2011. Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. [en línea]. *Agrociencia* Vol. 45, No. 8, México. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000800003, [Consulta: 25 de julio de 2016].
56. REYES, I. et al. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. Catálogo de trabajos presentados en el Primer Encuentro Internacional sobre Solubilización Microbiana de Fósforo, Salamanca, España. Publicado por Springer, 2007. Pág. 69-75.
57. COVACEVICH, F. et al. 2014. Microorganismos potenciales promotores de crecimiento nativos de suelos de Buenos Aires con manejo contrastante. Trabajo presentado en XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, II Reunión Nacional "Materia Orgánica y Sustancias Húmicas", Producción sustentable en ambientes frágiles. Bahía Blanca, Argentina.
58. TAURIÁN, T. et al. 2009. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant-growth promoting activities. [en línea] *Plant soil* (2010) 329: 421-431. Springer Science. https://www.researchgate.net/publication/225206033_Phosphate-solubilizing_peanut_associated_bacteria_screening_for_plant_growth-promoting_activities_Plant_Soil, [Consulta: 18 de julio de 2016].
59. PLAZAS ARIZA, E. C. 2007. Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras. Trabajo de Grado para optar al título de Microbiólogo Industrial por la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, DC, Colombia.
60. RAMOS, E. y ZÚÑIGA, D. 2008. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. [en línea]. *Ecología Aplicada*, Vol. 7, Nos. 1 y 2, pp. 123-130. http://www.lamolina.edu.pe/ecolapl/articulo_15_vol_7_ecologia_aplicada.pdf, [Consulta: 25 de julio de 2016].

ANEXO

1. Recuentos

Cada tabla de recuentos se encuentra seguida de la tabla de cálculo del contenido hídrico de la muestra de suelo en cuestión. Cada par se halla identificado con un mismo color.

Tabla 1: Recuento de BAM en la etapa de trasplante, sitio cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-4	1	136	149,5	1,80E+06
	-4	2	163		
2	-5	1	193	138,5	1,58E+07
	-5	2	84		
3	-5	1	74	80,5	9,11E+06
	-5	2	87		
4	-5	1	65	76,5	8,46E+06
	-5	2	88		
5	-5	1	155	141	1,63E+07
	-5	2	127		
Testigo	-	1	0	0	0,00E+00
	-	2	0		
Media					1,03E+07

Tabla 2: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%)
1	157,72	141,1	42,42	16,84231861
2	153,65	144,1	40,6	9,22705314
3	157,42	149,78	42,58	7,126865672
4	157,25	150	45,07	6,90936815
5	160,7	146	40,78	13,970728

Tabla 3: Recuento de BSP en la etapa de trasplante, sitio cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-4	1	24	34,5	2,08E+06
	-4	2	45		
2	-4	1	25	23,5	1,34E+06
	-4	2	22		
3	-4	1	34	40	2,26E+06
	-4	2	46		
4	-4	1	33	33,5	1,85E+06
	-4	2	34		
5	-4	1	75	65	3,75E+06
	-4	2	55		
Testigo	-	1	0	-	0,00E+00
	-	2	0		
Media					2,26E+06

Tabla 4: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%g)
1	84,9	78,74	42,42	16,9603524
2	93,33	87,61	40,6	12,1676239
3	101,42	95,28	42,58	11,6508539
4	103,66	98,54	45,07	9,57546288
5	102,52	95,28	40,78	13,2844037

Tabla 5: Recuento de BAM en la etapa de trasplante, sitio no cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-5	1	114	109,5	1,18E+07
	-5	2	105		
2	-5	1	125	138	1,52E+07
	-5	2	151		
3	-5	1	174	168,5	1,86E+07
	-5	2	163		
4	-5	1	77	89,5	1,01E+07
	-5	2	102		
5	-5	1	106	108	1,18E+07
	-5	2	110		
Testigo	-	1	0	0	0,00E+00
	-	2	0		
Media					1,35E+07

Tabla 6: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%g)
1	82,94	80,29	43,11	7,1274879
2	91,94	87,46	39,99	9,4375395
3	72,7	69,78	39,46	9,63060686
4	87,34	82,78	42,78	11,4
5	109,51	104,25	43,64	8,6784359

Tabla 7: Recuento de BSP en la etapa de trasplante, sitio no cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-4	1	26	25,5	1,37E+06
	-4	2	25		
2	-4	1	29	41,5	2,29E+06
	-4	2	54		
3	-4	1	33	36,5	2,02E+06
	-4	2	40		
4	-4	1	29	32	1,81E+06
	-4	2	35		
5	-4	1	36	53	2,90E+06
	-4	2	70		
Testigo	-	1	0	-	0,00E+00
	-	2	0		
Media					2,08E+06

Tabla 8: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%g)
1	82,94	80,29	43,11	7,1274879
2	91,94	87,46	39,99	9,4375395
3	72,7	69,78	39,46	9,63060686
4	87,34	82,78	42,78	11,4
5	109,51	104,25	43,64	8,6784359

Tabla 9: Recuento de BAM en la etapa de floración, sitio cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-5	1	119	113	1,35E+07
	-5	2	107		
2	-5	1	77	83	9,12E+06
	-5	2	89		
3	-4	1	300	286	3,17E+06
	-4	2	272		
4	-5	1	64	93,5	1,03E+07
	-5	2	123		
5	-4	1	151	171	1,92E+06
	-4	2	191		
Testigo	-	1	0	0	0,00E+00
	-	2	0		
Media					7,59E+06

Tabla 10: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%g)
1	154,07	138,54	42,42	16,15688722
2	161,78	151,81	40,6	8,965021131
3	162,92	152,31	42,58	9,669188007
4	163,08	153,52	45,07	8,815122176
5	168,78	156,35	40,78	10,75538635

Tabla 11: Recuento de BSP en la etapa de floración, sitio cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-3	1	74	61,5	3,50E+05
	-3	2	49		
2	-3	1	7	22,5	1,26E+05
	-3	2	38		
3	-3	1	79	67,5	3,75E+05
	-3	2	56		
4	-4	1	10	8	4,44E+05
	-4	2	6		
5	-3	1	142	156,5	9,29E+05
	-3	2	171		
Testigo	-	1	0	0	0,00E+00
	-	2	0		
Media					4,45E+05

Tabla 12: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%g)
1	115,61	107,71	42,42	12,09986215
2	87	82,54	40,6	10,63423939
3	114,95	108,41	42,58	9,934680237
4	102,81	97,56	45,07	10,00190512
5	106,52	97,58	40,78	15,73943662

Tabla 13: Recuento de BAM en la etapa de floración, sitio no cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-5	1	115	118	1,42E+07
	-5	2	121		
2	-5	1	107	106,5	1,17E+07
	-5	2	106		
3*	-4	1	515	511,5	5,51E+06
	-4	2	508		
4	-5	1	90	108	1,16E+07
	-5	2	126		
5	-5	1	114	135	1,57E+07
	-5	2	156		
Testigo	-	1	0	-	0,00E+00
	-	2	0		
Media					1,17E+07

Tabla 14: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%g)
1	157,72	141,1	42,42	16,84231861
2	153,65	144,1	40,6	9,22705314
3	157,42	149,78	42,58	7,126865672
4	157,25	150	45,07	6,90936815
5	160,7	146	40,78	13,970728

Tabla 15: Recuento de BSP en la etapa de floración, sitio no cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-4	1	19	16,5	8,67E+05
	-4	2	14		
2	-5	1	2	2	1,04E+06
	-5	2	-----		
3	-4	1	8	9,5	4,96E+05
	-4	2	11		
4	-4	1	7	6	3,09E+05
	-4	2	5		
5	-4	1	10	17	8,78E+05
	-4	2	24		
Testigo	-	1	0	-	0,00E+00
	-	2	0		
Media					7,19E+05

Tabla 16: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%g)
1	99,8	97,18	43,11	4,84557056
2	102,41	99,94	39,99	4,12010008
3	113,49	110,54	39,46	4,15025324
4	122,18	120	42,78	2,82310282
5	110,87	108,76	43,64	3,24017199

Tabla 17: Recuento de BAM en la etapa de maduración de frutos, sitio cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-5	1	167	156,5	1,92E+07
	-5	2	146		
2	-5	1	155	148,5	1,76E+07
	-5	2	142		
3	-5	1	140	128	1,51E+07
	-5	2	116		
4	-5	1	320	279,5	3,31E+07
	-5	2	239		
5	-5	1	136	131,5	1,61E+07
	-5	2	127		
Testigo	-	1	0	0	0,00E+00
	-	2	0		
Media					2,02E+07

Tabla 18: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%g)
1	103,59	94	42,42	18,5924777
2	123,26	112,05	40,6	15,68929321
3	129,1	117,71	42,58	15,16038866
4	93,22	86,75	45,07	15,52303263
5	126,54	113,28	40,78	18,28965517

Tabla 19: Recuento de BSP en la etapa de maduración de frutos, sitio cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-4	1	16	28,5	1,75E+06
	-4	2	41		
2	-4	1	25	31	1,84E+06
	-4	2	37		
3	-4	1	39	32,5	1,92E+06
	-4	2	26		
4	-5	1	17	27	1,60E+07
	-5	2	37		
5	-4	1	37	39	2,39E+06
	-4	2	41		
Testigo	-	1	0	0	0,00E+00
	-	2	0		
Media					4,77E+06

Tabla 20: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%g)
1	103,59	94	42,42	18,5924777
2	123,26	112,05	40,6	15,68929321
3	129,1	117,71	42,58	15,16038866
4	93,22	86,75	45,07	15,52303263
5	126,54	113,28	40,78	18,28965517

Tabla 21: Recuento de BAM en la etapa de maduración de frutos, sitio no cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-5	1	103	92	1,03E+07
	-5	2	81		
2	-5	1	119	109	1,19E+07
	-5	2	99		
3	-5	1	157	218	2,36E+07
	-5	2	279		
4	-5	1	127	144,5	1,58E+07
	-5	2	162		
5	-5	1	187	182	2,00E+07
	-5	2	177		
Testigo	-	1	0	0	0,00E+00
	-	2	0		
Media					1,63E+07

Tabla 22: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%g)
1	75,37	72,22	43,11	10,8210237
2	78,37	75,48	39,99	8,143138912
3	83,32	80,23	39,46	7,579102281
4	79,29	76,5	42,78	8,274021352
5	92,67	88,57	43,64	9,125306032

Tabla 23: Recuento de BSP en la etapa de maduración de frutos, sitio no cultivado.

Muestra	Dilución	Caja	Recuento	Promedio	UFC/g suelo seco
1	-4	1	13	17	9,53E+05
	-4	2	21		
2	-4	1	33	25,5	1,39E+06
	-4	2	18		
3	-4	1	26	26,5	1,43E+06
	-4	2	27		
4	-4	1	48	41,5	2,26E+06
	-4	2	35		
5	-4	1	94	78	4,29E+06
	-4	2	62		
Testigo	-	1	0	-	0,00E+00
	-	2	0		
Media					2,07E+06

Tabla 24: Determinación del contenido hídrico de las muestras de suelo, para el recuento precedente.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Tara (g)	W (g%g)
1	75,37	72,22	43,11	10,8210237
2	78,37	75,48	39,99	8,143138912
3	83,32	80,23	39,46	7,579102281
4	79,29	76,5	42,78	8,274021352
5	92,67	88,57	43,64	9,125306032

2. Cálculo del Índice de Solubilización (IS)

Para la interpretación de la tabla a continuación, se debe considerar las siguientes referencias:

Suelo inculto

Sitio de la parcela en donde se obtuvo la muestra desde la que se aisló la cepa.

Suelo cultivado

3,18616352

Índice de Solubilización mayor a 2. Cepas que se probaron luego en medio líquido.

IS: índice de solubilización

Tabla 25: Detalle del cálculo del Índice de Solubilización de las cepas solubilizadoras de P aisladas en cada etapa.

Cepa	Tamaño colonia (mm)			Tamaño colonia + halo (mm)			IS	Etapa
	Diámetro mayor	Diámetro menor	Media	Diámetro mayor	Diámetro menor	Media		
17	4,14	2,51	3,325	4,14	2,51	3,325	1	Floración
18	6,15	2,78	4,465	6,79	4,4	5,595	1,25307951	
5	9,25	6,1	7,675	10,47	6,96	8,715	1,13550489	
40	6,29	3,82	5,055	7,88	5,3	6,59	1,30365974	
25	17,51	12,41	14,96	18,12	14,04	16,08	1,07486631	
43	6,93	3,6	5,265	7,43	4,24	5,835	1,10826211	
19	5,97	3,48	4,725	6,67	4,98	5,825	1,23280423	
42	7,14	5,78	6,46	7,4	6,18	6,79	1,05108359	
12	5,69	4,05	4,87	21,29	18,98	20,135	4,13449692	
21	3,87	2,39	3,13	10,76	8,61	9,685	3,0942492	
27	3,41	3,4	3,405	3,82	3,82	3,82	1,12187959	
20	5,99	1,96	3,975	13,2	12,13	12,665	3,18616352	
31	8,32	6,29	7,305	9,3	7,64	8,47	1,15947981	
15	4,2	2,69	3,445	11,86	11,79	11,825	3,43251089	
35	4,94	2,63	3,785	5,46	3,34	4,4	1,16248349	
28	6,75	4,73	5,74	7,63	6,36	6,995	1,21864111	
38	6,02	2,72	4,37	7,08	4,49	5,785	1,32379863	
34	6,59	2,6	4,595	7,17	3,25	5,21	1,13384113	
9	16,41	12,01	14,21	17,26	12,85	15,055	1,05946517	
36	5,99	3,81	4,9	6,74	4,77	5,755	1,1744898	
3	19,76	12,78	16,27	20,65	14,84	17,745	1,09065765	
37	5,42	1,76	3,59	5,77	2,96	4,365	1,21587744	
29	5,83	2,09	3,96	11,35	8,74	10,045	2,53661616	
16	7,32	4,32	5,82	7,89	4,32	6,105	1,04896907	
7	9,35	8,04	8,695	9,89	9,25	9,57	1,10063255	
6	12,65	7,69	10,17	14,19	9,83	12,01	1,18092429	
8	3,68	1,48	2,58	8,52	8,06	8,29	3,21317829	
26	8,11	6,96	7,535	8,11	6,96	7,535	1	
1	20,2	12,08	16,14	21	14,23	17,615	1,09138786	
32	5,88	3,66	4,77	6,19	5,18	5,685	1,1918239	
13	5,68	2,74	4,21	19,71	20,5	20,105	4,77553444	
11	4,58	2,83	3,705	17,79	19,08	18,435	4,9757085	
22	6,3	3,05	4,675	12,23	11,99	12,11	2,59037433	

44	9,3	5,6	7,45	22	21,3	21,65	2,90604027	
45	14,64	7,6	11,12	19,2	9,3	14,25	1,28147482	
46	23,89	8,43	16,16	26,74	10,72	18,73	1,15903465	
47	7,94	5,76	6,85	6,6	6,6	6,6	0,96350365	
48	9,56	7,61	8,585	18,32	16,9	17,61	2,05125218	
49	7,04	5,87	6,455	7,57	6,14	6,855	1,06196747	
50	7,96	6,96	7,46	21,22	16,32	18,77	2,51608579	
51	8,76	7,01	7,885	17,88	17,12	17,5	2,21940393	
52	7,47	6,33	6,9	13,42	9,54	11,48	1,66376812	
53	10,35	6,05	8,2	13,63	10,6	12,115	1,47743902	
54	1,81	1,75	1,78	2,43	2,3	2,365	1,32865169	
55	7,11	5,66	6,385	7,11	5,66	6,385	1	
56	8,03	7,11	7,57	8,03	7,11	7,57	1	
57	8,03	7,29	7,66	8,03	7,29	7,66	1	
58	8,24	7,29	7,765	8,24	7,29	7,765	1	
59	12,25	5,34	8,795	28,22	24,93	26,575	3,02160318	
60	18,48	7,01	12,745	36,46	28,95	32,705	2,56610435	
61	11,81	8,06	9,935	13,76	11,24	12,5	1,25817816	
62	10,22	7,05	8,635	15,52	10,61	13,065	1,51302837	
63	7,94	7,05	7,495	7,94	7,05	7,495	1	
64	12,62	5,13	8,875	15,71	13,06	14,385	1,62084507	
65	7,43	5,14	6,285	12,35	9,23	10,79	1,716786	
66	8,6	5,79	7,195	11,46	9,47	10,465	1,45448228	
67	8,28	6,31	7,295	11,24	9,54	10,39	1,42426319	
68	12,13	7,85	9,99	14,7	11,56	13,13	1,31431431	
69	9,84	6,79	8,315	18,33	15,32	16,825	2,02345159	
70	9,06	6,02	7,54	19,39	16,51	17,95	2,3806366	
71	9,98	7,16	8,57	12,11	9,06	10,585	1,23512252	
72	6,72	5,34	6,03	6,72	5,34	6,03	1	
73	7,1	5,41	6,255	7,1	5,41	6,255	1	
74	0	0	0	0	0	0	0	
75	10,01	6,37	8,19	10,01	6,37	8,19	1	
76	9,35	3,41	6,38	9,35	3,41	6,38	1	
77	5,19	4,11	4,65	6,42	4,76	5,59	1,20215054	
78	10,73	6,34	8,535	10,73	6,34	8,535	1	
79	22,44	7,43	14,935	22,44	7,43	14,935	1	

Maduración

80	6,88	5,1	5,99	6,88	5,1	5,99	1	Maduración
81	8,69	4,91	6,8	8,86	5,96	7,41	1,08970588	
82	9,69	5,09	7,39	9,69	5,09	7,39	1	
83	6,8	5,75	6,275	18,12	16,69	17,405	2,77370518	
84	7,09	5,1	6,095	8,08	5,61	6,845	1,12305168	
85	8,27	6,22	7,245	8,27	6,22	7,245	1	
86	1,55	1,54	1,545	2,23	2,19	2,21	1,43042071	
87	8,96	5,84	7,4	10,3	7,31	8,805	1,18986486	
88	9	6,26	7,63	9,98	7,51	8,745	1,14613368	
89	11,68	7,53	9,605	11,68	7,53	9,605	1	
90	8,38	5,21	6,795	8,93	5,86	7,395	1,08830022	
91	8,84	8,11	8,475	9,4	9,39	9,395	1,10855457	
92	2,9	2,88	2,89	3,27	3,13	3,2	1,10726644	
93	12,5	8,1	10,3	13,32	8,9	11,11	1,07864078	
94	5,21	5,22	5,215	11,58	9,65	10,615	2,03547459	
95	8,75	7,07	7,91	10,35	10,27	10,31	1,3034134	
96	0	0	0	0	0	0	0	
97	12,07	7,7	9,885	12,81	6,56	9,685	0,97976732	
98	6,43	5,77	6,1	6,43	5,77	6,1	1	
99	7,29	5,92	6,605	7,29	5,92	6,605	1	
100	9,54	6,98	8,26	9,54	6,98	8,26	1	
101	10,12	8,92	9,52	10,12	8,92	9,52	1	
102	8,11	6,27	7,19	8,11	6,27	7,19	1	
103	6,02	6	6,01	6,02	6	6,01	1	
104	7,27	4,92	6,095	7,27	4,92	6,095	1	
105	8,87	6,8	7,835	10,13	7,97	9,05	1,15507339	
106	13,93	7,34	10,635	13,93	7,34	10,635	1	
107	9,51	6,95	8,23	9,51	6,95	8,23	1	
108	7,46	5,29	6,375	7,46	5,29	6,375	1	
109	0	0	0	0	0	0	0	
110	9,08	4,88	6,98	11,95	8,89	10,42	1,49283668	

Maduración

Trasplante

111	7,68	5,26	6,47	7,68	5,26	6,47	1	
112	7,48	7,54	7,51	7,9	7,58	7,74	1,03062583	
113	8,61	6,02	7,315	8,65	6,27	7,46	1,01982228	
114	8,82	3,27	6,045	9,22	6,35	7,785	1,28784119	
115	7,05	6,34	6,695	10,65	9,85	10,25	1,53099328	
116	8,25	5,07	6,66	8,98	5,22	7,1	1,06606607	
117	4,06	2,23	3,145	4,23	2,41	3,32	1,05564388	
118	7,99	4,71	6,35	7,99	4,71	6,35	1	
119	0	0	0	0	0	0	0	
120	8,1	6,17	7,135	8,1	6,17	7,135	1	
121	8,9	12,88	10,89	8,9	12,88	10,89	1	
122	0	0	0	0	0	0	0	
123	9,87	7,78	8,825	9,87	7,78	8,825	1	
124	6,67	7,52	7,095	6,67	7,52	7,095	1	
125	3,33	1,86	2,595	3,33	1,86	2,595	1	
126	7,94	6,56	7,25	8,22	8,22	8,22	1,1337931	
127	3,15	2,76	2,955	3,15	2,76	2,955	1	Trasplante
128	0	0	0	0	0	0	0	
129	8,07	7,9	7,985	8,07	7,9	7,985	1	
130	0	0	0	0	0	0	0	
131	11,59	4,91	8,25	11,59	4,91	8,25	1	
132	7,99	4,77	6,38	7,99	4,77	6,38	1	
133	14,49	5,23	9,86	14,49	5,23	9,86	1	
134	8,93	7,11	8,02	11,1	8,69	9,895	1,23379052	
135	6,09	5,47	5,78	6,09	5,47	5,78	1	
136	7,46	6,01	6,735	7,46	6,01	6,735	1	
137	0	0	0	0	0	0	0	
138	6,76	6,6	6,68	6,76	6,6	6,68	1	
139	1,45	1,4	1,425	1,45	1,4	1,425	1	
140	7,84	6,23	7,035	7,84	6,23	7,035	1	
141	5,99	5,34	5,665	5,99	5,34	5,665	1	
142	8,44	7,57	8,005	8,44	7,57	8,005	1	
143	0	0	0	0	0	0	0	

3. Cálculo del fósforo disuelto en medio líquido

3.1. Fundamento de la técnica y preparación del reactivo colorimétrico

Se trabajó inicialmente con una solución incolora de ácido sulfomolibdico, preparada por personal docente de la cátedra de Edafología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias, a partir de la disolución de molibdato de amonio en ácido sulfúrico 25N. El reactivo colorimétrico se obtuvo mezclando 44 g de la solución sulfomolibdica con 0,25 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) en polvo y agitando completamente hasta la desaparición del sólido. La solución final resultó de color amarillo claro.

En la técnica de coloración de Murphy y Riley los iones ortofosfato reaccionan con los iones molibdato en solución sulfúrica. El producto resultante es el ácido molibdofosfórico, el cual en presencia de ácido ascórbico se reduce a azul de fosfomolibdeno (40).

3.2. Curva patrón de P

Se prepararon 7 soluciones de fósforo de concentraciones conocidas. Se trabajó con 10, 25, 50, 100, 150, 200 y 400 ppm, obtenidas por dilución a partir de una solución patrón de 1000 ppm. La fórmula aplicada para la obtención de las diluciones fue:

$$C1.V1 = C2.V2$$

Donde:

C1 = concentración inicial conocida (para la primera dilución fue igual a 1000ppm).

V1 = volumen de la alícuota que se debe tomar de la solución con concentración conocida C1 para llevarla luego a la concentración deseada C2, aforando hasta un volumen V2 con agua.

C2 = concentración final a la que se quiere llegar.

V2 = volumen final que se debe alcanzar por la sumatoria del V1 y el aforo del recipiente con agua destilada. Es un valor que depende del tamaño del recipiente utilizado.

En matraces de vidrio, lavados con ácido clorhídrico 1N, se agregaron 0,5 ml de solución patrón, 2 ml de reactivo colorimétrico y se enrasó con agua destilada hasta los 10 ml. Se aguardó por 30 minutos para la formación del color azul, en correspondencia con los complejos químicos formados por la reacción entre el fósforo disponible y el reactivo colorimétrico. Cada coloración se hizo por duplicado y la intensidad del color fue consecuente con la concentración de P en solución (Tabla 27). Se midió luego la absorbancia de los patrones con espectrofotómetro, a una longitud de onda de 660nm, y se obtuvo la curva correspondiente junto a su fórmula asociada (Figura 1).

Tabla 27: Cálculo de curva patrón de P disponible.

Concentración solución patrón de P (ppm)	Absorbancia (660nm)	Repetición	Media
10	0,054	0,054	0,054
25	0,137	0,137	0,137
50	0,288	0,315	0,3015
100	0,519	0,543	0,531
150	0,956	0,968	0,962
200	1,01	1,395	1,2025
400	1,913	1,922	1,9175

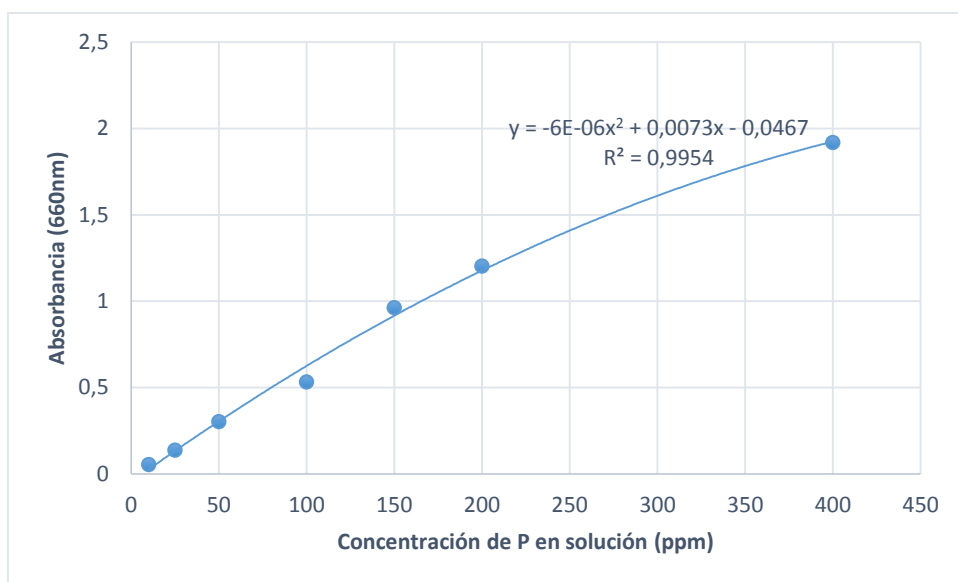


Figura 1: Curva patrón de P disponible. Se muestra también la ecuación del ajuste polinómico de orden 2 y el coeficiente de regresión correspondiente. Los valores de absorbancia son el promedio de dos repeticiones.

3.3. P solubilizado por las BSP

De igual manera se procedió con las muestras problema y se calculó las ppm de P solubilizado en medio líquido. Se reemplazó en cada caso el valor de absorbancia leído por espectrofotometría en la ecuación de la curva patrón.

La tabla que se muestra a continuación (Tabla 28) detalla el cálculo realizado a partir de la absorbancia medida para cada cepa cultivada en medio líquido. Los valores de absorbancia se reemplazaron en la fórmula de ajuste de la curva patrón (eje y) y la concentración se despejó luego (eje x); cada absorbancia resultó del promedio de dos mediciones. En cada caso se midió además la absorbancia de un “blanco”, correspondiente a medio NBRIP líquido incubado en las mismas condiciones que las muestras problema, pero sin haber sido inoculados con cepa alguna. El valor final de las *ppm de P solubilizado* fue la diferencia entre la concentración hallada en la muestra y la encontrada en la solución blanco.

Tabla 28: Cálculo de P solubilizado en medio NBRIP líquido.

Cepa	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media abs.	Absorbancia Blanco 1	Absorbancia Blanco 2	Media abs. blanco	ppm P cepa	ppm P blanco	ppm P solubilizado
12	0,449	0,466	0,4575	0,037	0,068	0,0525	73,50989414	13,74430626	59,76558788
13	0,549	0,58	0,5645	0,037	0,068	0,0525	90,45035642	13,74430626	76,70605015
21	1,045	1,03	1,0375	0,037	0,068	0,0525	173,1673369	13,74430626	159,4230306
11	0,34	0,377	0,3585	0,037	0,068	0,0525	58,30050603	13,74430626	44,55619977
44	1,22	1,132	1,176	0,037	0,068	0,0525	200,5513927	13,74430626	186,8070864
48	0,48	0,459	0,4695	0,037	0,068	0,0525	75,38294999	13,74430626	61,63864372
22	1,239	1,312	1,2755	0,033	0,029	0,031	221,4189012	10,73861746	210,6802838
59	0,443	0,364	0,4035	0,033	0,029	0,031	65,16106682	10,73861746	54,42244936
60	0,268	0,245	0,2565	0,033	0,029	0,031	43,05808081	10,73861746	32,31946336
94	0,476	0,471	0,4735	0,026	0,029	0,0275	76,00876651	10,25074892	65,75801759
51	0,617	0,548	0,5825	0,026	0,029	0,0275	93,35490876	10,25074892	83,10415984
20	0,158	0,139	0,1485	0,03	0,033	0,0315	27,35475274	10,80834548	16,54640726
69	0,349	0,326	0,3375	0,03	0,033	0,0315	55,12802686	10,80834548	44,31968138
50	0,114	0,114	0,114	0,03	0,033	0,0315	22,42710269	10,80834548	11,61875721
29	0,026	0,017	0,0215	0,03	0,033	0,0315	9,415327445	10,80834548	-1,393018034
83	0,344	0,404	0,374	0,03	0,033	0,0315	60,65388532	10,80834548	49,84553984
8	0,058	0,049	0,0535	0,03	0,033	0,0315	13,88447561	10,80834548	3,076130135
15	0,081	0,081	0,081	0,03	0,033	0,0315	17,75216947	10,80834548	6,943823991
70	0,412	0,387	0,3995	0,03	0,033	0,0315	64,54773424	10,80834548	53,73938876

3.4. Listado de materiales

Balanza CS200-00A. Portable Scale. OHAUS CORPORATION USA.

Vórtex Fbr®. Decalab S.R.L.

Estufa TDC 140. TECNO DALVO Equipos para laboratorio. (Incubación de cepas).

Estufa termorregulable. Modelo 60-8. CIENTIFICA CENTRAL, JACOBO RAPOPORT S.A.
(Secado de muestras de suelo).

Estufa con agitador Multitron S-000116736. INFORS HT. 2011.

Refrigerador Congelador RS 35-36. SAIAR, Finpak S.A.

Centrífuga electrónica Gelec®. G 134 D.

Cajas de Petri descartables de 90 mm. AGB®. Grupo Indulab S.R.L.