

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMIA**

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL TRIGO (*Triticum aestivum*), INOCULADO  
CON BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO Y UNA CEPA FIJADORA DE  
NITROGENO, AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE ESPECIES ARBUSTIVAS.**

Tesis presentada como parte de los  
requisitos para optar al grado de  
licenciado en Agronomía

**MARTA MARIBEL NIKLITSCHK OYARZO.**

VALDIVIA – CHILE

**2008.**

**COMISION.**

Profesor patrocinante

Luigi Ciampi P.  
Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

-----

Profesores informantes

Ricardo Fuentes  
Ing. Agr., M.Sc

-----

Daniel Calderini  
Ing. Agr., Ph. D.

-----

**INDICE DE MATERIAS.**

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
1.	INTRODUCCIÓN.	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.	3
2.1	El fósforo (P) en la agricultura.	3
2.2	Fuentes de P y su agotamiento.	3
2.3	Formas de P en el suelo.	4
2.3.1	P inorgánico.	4
2.3.2	P orgánico.	5
2.4	Fijación de P en el suelo.	5
2.5	La importancia del P para las plantas.	6
2.6	Formas de absorción del P por la planta.	6
2.7	Microorganismos (MO) de la rizósfera.	7
2.8	Solubilización biológica del P.	7
2.9	MO encargados de la solubilización del P.	8
2.10	Mecanismos abióticos de la Solubilización de P.	9
3.	MATERIAL Y METODO.	10
3.1	Material.	10
3.1.1	Medios de cultivos utilizados.	10
3.1.2	Equipos.	10
3.1.3	Otros materiales	10
3.2	Método.	11
3.2.1	Obtención de muestras arbustivas.	11
3.2.2	Aislamiento de cepas bacterianas.	11
3.2.3	Pruebas de solubilización biológica de fósforo.	12
3.2.4	Efecto sobre el pH en medio líquido.	12

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
3.2.5	Medición de unidades formadoras de colonia (ufc/ml). 13
3.2.6	Clasificación de las BSP. 13
3.2.7	Evaluación de cepas en trigo en macetas. 16
3.2.8	Encapsulación de bacterias utilizadas para la evaluación del trigo en macetas. 19
3.2.9	Evaluación del ensayo en macetas. 19
3.2.10	Análisis estadístico. 20
4.	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS 21
4.1	Obtención y selección de bacterias solubilizadoras de P de la rizósfera y raíces de arbustos. 21
4.2	Determinación del Índice de Solubilización (I.S.) de P de los diez mejores aislamientos. 22
4.3	Determinación del cambio de pH en caldo PVK por acción de diez cepas seleccionadas con la capacidad de solubilizar P. 24
4.4	Recuento de unidades formadoras de colonia por ml (ufc/mL) en CP 26
4.5	Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación taxonómica de cepas bacterianas. 28
4.5.1	Pruebas morfológicas y tintoriales. 28
4.5.2	Pruebas bioquímicas para la determinación de Pseudomonas. 29
4.5.3	Pruebas bioquímicas para la identificación de Enterobacterias. 31
4.6	Evaluación de las cepas bacterianas en plantas de trigo. 33
4.6.1	Producción de materia seca total de plantas de trigo. 33
4.6.1.1	Producción de materia seca aérea de plantas de trigo. 36
4.6.1.1.1	Evaluación de área foliar de plantas de trigo. 40
4.6.1.1.2	Evaluación de la altura de plantas de trigo. 42
4.6.1.1.3	Producción de materia seca de espigas en plantas de trigo. 43
4.6.1.2	Producción de materia seca radical de plantas de trigo. 45
4.6.1.2.1	Evaluación de la superficie radical de plantas de trigo. 48
4.6.1.2.2	Evaluación del largo total de raíces de plantas de trigo. 49
4.6.1.2.3	Evaluación del diámetro radical en plantas de trigo. 50

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
4.6.2	Rendimiento del trigo.	53
4.6.2.1	Producción de granos por metro cuadrado en plantas de trigo.	55
4.6.2.1.1	Producción de espigas por metro cuadrado en plantas de trigo.	56
4.6.2.2	Producción de materia seca de granos en plantas de trigo	57
4.6.2.3	Peso seco de 1000 granos.	58
4.7	P disponible en el suelo antes y después del ensayo	61
5	CONCLUSIONES.	64
6	RESUMEN.	66
	SUMMARY.	67
7	BIBLIOGRAFIA.	68
	ANEXOS.	72

## INDICE DE CUADROS.

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Principales formas de fosfato inorgánico, denominación, composición y características en el suelo	5
2	Análisis químico de un suelo Trumao de la comuna de Los Muermos, de la Décima Región, utilizado para la evaluación del trigo en macetas.	17
3	Código de cada tratamiento, bacteria y fertilización fosforada	18
4	Nombre científico de cepas solubilizadoras de P seleccionadas y su procedencia.	22
5	Promedio de tres repeticiones del Índice de Solubilización de las diez cepas seleccionadas.	23
6	Recuento de (ufc/mL) de diez BSP seleccionadas a densidad óptica de 0,3.	27
7	Recuento de ufc/mL a densidad óptica de 0,6.	27
8	Clasificación de las diez bacterias seleccionadas según Gram, morfología celular y motilidad.	29
9	Pruebas bioquímicas para determinar si las cepas pertenecen al género <i>Pseudomonas</i> .	30
10	Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas del género <i>Pseudomonas</i> , para determinar su especie.	31
11	Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas MN4, MN106, MN108 y MN110, para determinar si pertenecen a la familia de las Enterobacterias.	32
12	Alto de plantas de trigo (cm) en el tercer corte, con diferentes inoculantes y fertilización fosforada.	42
13	Materia seca de raíz (mg), en el primer y segundo cortes de trigo con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	46
14	Superficie de raíces (cm <sup>2</sup> ), en dos cortes de trigo, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	49

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
15	Largo total de raíces de trigo (cm.), en dos cortes, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	50
16	Peso seco de los 1000 granos (g), en trigo, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	59
17	Ppm de P-Olsen analizado del suelo seleccionado de un bosque de Valdivia, antes y después del ensayo de macetas de trigo.	61

## INDICE DE FIGURAS.

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Placas Petri que ilustran dos colonias bacterianas solubilizadoras de P. Es posible apreciar un halo de solubilización alrededor de cada colonia. Prueba realizada en el medio agar PVK. Foto de la izquierda corresponde al primer día, imagen derecha, séptimo día.	24
2	Variación de pH en caldo PVK durante siete días de incubación, para diez cepas solubilizadoras de P y un blanco (sin bacteria).	25
3	Materia seca total (mg), por planta de trigo, en el estado de tres hojas con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	33
4	Materia seca total (mg), por planta de trigo, en el estado de floración con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	34
5	Materia seca total (mg), por planta de trigo, en el estado de grano seco con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	35
6	Materia seca aérea de plantas del trigo (mg) en el primer corte, inoculado con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	37
7	Materia seca aérea de plantas del trigo (mg) en el estado de floración, inoculado con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	38
8	Materia seca aérea de plantas del trigo (mg) en el estado grano seco, inoculado con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	39
9	Área foliar de plantas de trigo inoculado con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada, en estado de tres hojas.	40
10	Área foliar de plantas de trigo inoculado con distintas cepas bacterianas y diferente fertilización fosforada, en estado de floración.	41
11	Materia seca de espigas (mg) por planta, en el estado de floración con diferentes cepas bacterianas y fertilización fosforada.	44
12	Materia seca de espigas (mg) por planta, en el estado de grano seco con diferentes cepas bacterianas y fertilización fosforada.	45



<b>Figura</b>		<b>Página</b>
13	Materia seca de raíz (mg), en el estado de grano seco con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	47
14	Diámetro de raíces (mm), en el estado de tres hojas, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	51
15	Diámetro de raíces (mm), en el estado de floración, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	52
16	Rendimiento del trigo ( $\text{g/m}^2$ ), con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	53
17	Número de granos de trigo por $\text{m}^2$ con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	55
18	Número de espigas por metro cuadrado en estado de grano seco de trigo, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	57
19	Peso seco de granos de trigo (mg) con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.	58

**INDICE DE ANEXOS.**

<b>Anexos</b>	<b>Página</b>
1 Composición del medio agar P Pseudomona base.	73
2 Composición del medio agar nutritivo.	73
3 Composición del medio AT salts.	73
4 Composición del medio PGY (Peptona-glucosa-extracto de levadura).	74
5 Composición del medio Pikovskaya (PVK).	74
6 Composición del medio agar peptona (AP).	74
7 Composición del caldo peptona (CP).	75
8 Composición del medio agar papa dextrosa.	75
9 Composición del medio Agar King B.	75
10 Composición del medio Agar King A.	75
11 Composición del medio Agar citrato Simmons.	76
12 Composición del medio de cultivo OF.	76
13 Composición del medio Agar urea de Christensen.	76
14 Composición del medio TSI (triple azúcar, hierro).	77
15 Composición del medio Agar con almidón.	77
16 Composición del medio gelatina nutritiva.	77
17 Composición del medio MIO.	78
18 Composición del medio LIA.	78
19 Valores promedios del rendimiento del trigo medido en kilogramos por hectárea y quintales métricos por hectárea, para diferentes tratamientos del tercer corte.	78

## 1 INTRODUCCION

El fósforo (P), es uno de los nutrientes esenciales más importantes después del nitrógeno, para el crecimiento y desarrollo de las plantas en todas sus etapas fisiológicas. Sin embargo, es a la vez, el elemento que está en menor disposición en muchos suelos, para ser absorbido por la planta. Además, es un elemento no renovable y su sobreexplotación en los yacimientos hace que éstos se agoten rápidamente, quedando cada vez menos de éste elemento disponible para su uso.

Las plantas absorben P desde la solución del suelo como fosfato. Sin embargo, al ser tan reactivo, la mayoría está inmovilizado con otros elementos del suelo como son el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en suelos alcalinos y el  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Al}^{3+}$  en suelos ácidos. Por lo tanto, una baja proporción de P total está disponible para las plantas.

La agricultura intensiva requiere de muchos gastos de insumos como lo son los fertilizantes fosforados, pero al agregar nutrientes de éste tipo al suelo, la eficiencia para ser utilizado por la planta es baja. Una gran porción del P es rápidamente fijado, quedando en forma no disponible para la planta, ya que son adsorbidos por los coloides del suelo, sobre todo en los primeros días de su aplicación.

Además, la producción de fertilizantes fosforados inorgánicos requiere de mucho gasto de energía, lo que hace que los precios de éstos sean cada vez más elevados, aumentando los costos de producción. También el incremento en el uso de fertilizantes, está produciendo gran contaminación tanto del aire como de las aguas.

Por estos motivos, hay que hacer uso de prácticas más sustentables para la agricultura. Estas pueden incluir el uso de bacterias que solubilicen P y así hacer más eficiente el uso de fertilizantes fosforados poco solubles para las plantas. Éstas al actuar sobre el P poco soluble, dejarían mayor cantidad de P a disposición de la planta,

se ocuparían fertilizantes menos elaborados, que ocupen menos energía, disminuirían la contaminación ambiental y bajarían los costos de producción.

Las bacterias solubilizadoras de P tienen la capacidad de convertir formas insolubles de P a formas solubles utilizables para la planta. El mecanismo por el cual existe una solubilización del P inorgánico se debería a la producción de distintos ácidos orgánicos.

Como hipótesis de ésta tesis se plantea que: en la rizósfera y raíces de especies arbustivas de *Rubus* spp. y *Berberis microphylla* con crecimiento exagerado en un suelo Trumao del sur de Chile, existen bacterias con la capacidad de solubilizar P *in vitro*. Además se plantea que al inocular estas bacterias y al combinarla con una cepa fijadora de N al cultivo de trigo, se produciría un incremento en su producción.

**El objetivo general es:**

Aislar bacterias de la rizósfera y raíces de distintas especies vegetales silvestres con mayor crecimiento en un suelo Trumao de la Región de Los Lagos, con capacidad de solubilizar P en un medio sólido y evaluar su efecto en trigo.

**Los objetivos específicos son:**

- Seleccionar las diez mejores cepas solubilizadoras de P, del total de cepas aisladas.
- Comparar la solubilización entre las cepas seleccionadas.
- Determinar la variación de pH durante el tiempo y compararlo con la solubilización.
- Caracterizar las cepas a través de pruebas bioquímicas.
- Evaluar el efecto de tres bacterias solubilizadoras de P y una co-inoculación con una bacteria fijadora de N en trigo, variedad Pandora.

## 2 REVISION BIBLIOGRAFICA.

### 2.1 El fósforo (P) en la agricultura.

El P es esencial en todas las formas de vida conocidas, dado que constituye un elemento clave en muchos procesos fisiológicos y bioquímicos. Se trata de un componente presente en todas las células de todos los organismos vivos y es un elemento indispensable que no puede ser sustituido por ningún otro elemento. El P aparece en estructuras complejas como ADN y ARN que, al contener y codificar la información genética, controlan todos los procesos biológicos en las plantas, los animales y el hombre. Además, el P es un componente fundamental del sistema de transporte de energía en todas las células (ADP y ATP). El P no se encuentra aislado en la naturaleza, sino que siempre está combinado con otros elementos con los que forma los fosfatos que pueden ser muy complejos y presentarse bajo distintas formas en los suelos, el agua, las plantas, los animales y el hombre (DOMINGUEZ, 1997 y FAO, 2007).

### 2.2 Fuentes de P y su agotamiento.

El P está presente en el planeta como depósitos minerales, los cuales no son renovables como recurso natural (PRASAD Y POWER, 1997).

El P no es un elemento escaso en la naturaleza. Se trata del undécimo elemento en cuanto a abundancia en la corteza terrestre, pero la concentración de P en muchas rocas es muy pequeña. Sin embargo, existen depósitos que son suficientemente ricos en P y que hacen viable su extracción desde el punto de vista comercial. Los depósitos de rocas fosfóricas se encuentran por todo el mundo y, en la actualidad, cerca de treinta países están produciendo fosfatos para su utilización (EFMA, 2000).

Desde un punto de vista comercial, los principales depósitos de roca fosfórica global están estimadas a 41.000 millones de Mg, los países con mayor reserva son

Marruecos (20.000 millones de Mg), la ex Unión Soviética (8.000 millones de Mg), Estados Unidos (5.700 millones de Mg), Sudáfrica (1.800 millones de Mg), China (1.000 millones de Mg), Oeste de Sahara (850 millones de Mg), y Australia (800 millones de Mg) (PRASAD y POWER, 1997).

Los tres países a la cabeza en la producción, es decir, Estados Unidos, China, Marruecos, Sahara occidental y federación Rusa producen en la actualidad, aproximadamente el 72% del total del fósforo necesario a escala global (FAO, 2007).

DERY y ANDERSON, 2007 estiman que la producción mundial de fósforo alcanzó su máximo en el año 1989 y que, desde entonces, ha entrado en un declive permanente. No se acaba el recurso, sino que éste será cada vez más escaso.

Es difícil pronosticar de forma precisa cuánto tiempo podrían durar los suministros mundiales de fosfatos. Las estimaciones sobre las reservas actuales susceptibles de explotación son muy variables porque van de 50 a tan sólo 130 años (DERY y ANDERSON, 2007).

La producción de fertilizantes fosforados, es un proceso que requiere mucho gasto de energía. Se utilizan alrededor de US\$ 4 billones anuales para resolver la necesidad global (KHAN *et al.* 2006).

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

Existen dos formas de P en el suelo el P inorgánico y orgánico.

**2.3.1 P inorgánico.** El P en el suelo se encuentra casi exclusivamente como ion ortofosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  y derivados del ácido fosfórico  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , unidos al Ca y Al. Los compuestos formados pueden encontrarse en forma de sales en solución, sales cristalinas o sales adsorbidas por los coloides del suelo o puede formar enlaces de gran estabilidad con los hidróxidos de Fe, Al o Mn que forman partes de los coloides del suelo. Estos últimos constituyen el P fijado. También hay otras formas con menos solubilidad que los compuestos fosfatados orgánicos, ver Cuadro 1 y su abundancia variará de acuerdo a los niveles de materia orgánica y pH del suelo (MONTECINOS, 2003).

**CUADRO 1. Principales formas de fosfato inorgánico, denominación, composición y características en el suelo.**

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

**FUENTE: MONTECINOS, 2003.**

**2.3.2 P orgánico.** Las principales formas son el fosfato de inositol y los ácidos nucleicos. Tanto el inositol como los ácidos nucleicos, parecen tener origen principalmente microbiano. El nivel de P orgánico en los suelos puede variar entre un 3 y un 85% del fósforo total (MONTECINOS, 2003). El P orgánico puede componer una gran fracción del fosfato soluble, puede ser tanto como el 50%, en suelos con alto contenido de materia orgánica (KHAN *et al*, 2006).

## 2.4 Fijación de P en el suelo

Las plantas absorben P en estado soluble, sin embargo, cuando se introduce P al suelo, más del 90% de él pasa rápidamente a formas insolubles o no disponibles. Así, gran parte de los fertilizantes fosfatados que se aplican no son utilizados por las plantas, sino que se almacenan en el suelo. Los equilibrios de reacción del P, (que dependen de los coloides, minerales presentes en el suelo, pH, actividad microbológica, enzimas, ácidos orgánicos y la intensidad de demanda de nutrientes), llevan a que la mayor parte del P del suelo se encuentre en forma de baja o muy baja solubilidad. Solo una parte muy baja, entre 0,1 y 0,3 ppm, se encuentra realmente en

solución, plenamente disponible para plantas y microorganismos (MONTECINOS, 2003).

El P tiende a formar complejos insolubles con cationes di y trivalentes y también es adsorbido por los coloides del suelo (MORENO *et al*, 1998).

Por lo tanto, el nivel de la concentración de P en el suelo, depende de la solubilización y precipitación de los fosfatos unidos al Ca, Fe y Al, de la desorción y adsorción a los coloides del suelo y la mineralización e inmovilización del P orgánico (MADDONNI *et al*, 2004b).

## **2.5 La importancia del P para las plantas**

El P es el segundo nutriente mineral esencial, después del nitrógeno para la nutrición de las plantas. Es importante, y en ciertos casos esencial, como en el metabolismo celular y es uno de los nutrientes requeridos para el crecimiento y desarrollo de las plantas. El P desempeña un papel fundamental en la fotosíntesis, proceso por el que las plantas absorben la energía del sol para sintetizar moléculas de carbohidratos. Es decir, de azúcares, que son transportados a los órganos de almacenamiento de las plantas. Desempeña funciones estructurales en las macromoléculas como los ácidos nucleicos y de transferencia de energía en los procesos metabólicos de biosíntesis y degradación (FAO, 2007).

En las plantas se encuentra de un 0,05 a 0,5 % de P en sus tejidos, y está presente en muchos componentes o grupos de sustancias como: fosfolípidos, ácidos nucleicos y nucleoproteínas, azúcares fosforilados, coenzimas y compuestos relacionados. El P puede también estar presente en vacuolas y almacenadores intermediarios internos como ortofosfato inorgánico (ALEXANDER, 1961).

## **2.6 Formas de absorción del P por la planta**

La mayor absorción del P por las plantas es en forma de ion ortofosfato en la solución del suelo. Las plantas prefieren el ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (dihidrógenofosfato) que el ion  $\text{HPO}_4^{2-}$  (hidrógenofosfato) (WALKER, 1975). Éste ion queda disponible al solubilizarse o romperse cualquiera de los compuestos fosfatados (MONTECINOS, 2003).



Las plantas extraen el P del suelo por solubilización de los minerales, con intervención de los microorganismos, en función de sus necesidades (MORENO *et al.*, 1998).

## **2.7 Microorganismos (MO) de la rizósfera**

Los MO del suelo se encuentran en un equilibrio inestable, ya que sus poblaciones cambian con determinadas condiciones medioambientales. La mayoría de los MO son encontrados a uno o dos centímetros de las raíces de las plantas, zona denominada como rizósfera. Esto es porque la mayor cantidad de nutrientes se encuentra en ésta zona. El tipo de MO que se encuentran va a depender principalmente de la especie vegetal. Las células de las raíces de elongación y extremidades de las plantas entregan nutrientes y exudados radicales, también al morir los pelos radicales y células corticales, estos tejidos sirven de alimento para los MO. Las raíces laterales también son activas. Las raíces jóvenes y sanas exudan suficiente componentes orgánicos para soportar gran cantidad de MO. Los exudados radicales tienen muchos compuestos, pero en pequeñas cantidades como: azúcares, aminoácidos, péptidos, enzimas, vitaminas, ácidos orgánicos, nucleótidos y sustancias con actividad biológica (WALKER, 1975).

## **2.8 Solubilización biológica del P**

Los MO son importantes para la agricultura ya que estos promueven la circulación de nutrientes para las plantas y a su vez, disminuyen la fertilización química (SAHIN *et al.*, 2004).

Las plantas extraen P del suelo por solubilización de los minerales, con la intervención de MO, en función de sus necesidades. Ésta intervención en el ciclo del P ocurre en tres sentidos:

- Descomposición de compuestos orgánicos de P, con formación de fosfatos inorgánicos.
- Inmovilización de fosfatos en el material celular de las plantas.
- Solubilización del fósforo mineral.

En el paso final de la conversión de P orgánico a fosfatos inorgánicos en los suelos, intervienen enzimas fosfatasas. En los suelos existen dos tipos principales:

- Fosfatasas ácidas, cuya actividad óptima ocurre a pH de 4 a 6.
- Fosfatasas alcalinas, cuyo pH óptimo es de 9 a 11.

Los fosfatos insolubles de Fe, Al y Ca pueden liberarse a formas solubles por acción de ácidos orgánicos y quelatos producidos en la descomposición de la materia orgánica en la que intervienen MO, y los productos excretados por las raíces de la plantas (MORENO *et al*, 1998).

La mayoría del P inorgánico está no disponible para la planta, pero muchos organismos desde un décimo a la mitad del total de MO del suelo, tienen la capacidad de transformarlo y dejarlo soluble para la planta (ALEXANDER, 1961).

Los MO asimilan el elemento y dejan una larga porción soluble, aumentando la concentración de P. El principal compuesto que solubiliza el P insoluble es la producción de ácidos orgánicos por parte de algunas cepas de bacterias. Los ácidos orgánicos e inorgánicos, convierten el  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  a fosfato bi o monobásico, con un aumento de P disponible para las plantas (ALEXANDER, 1961).

## **2.9 MO encargados de la solubilización del P**

Algunos MO del suelo, incluyendo bacterias, hongos y actinomicetes, tienen la capacidad de convertir compuestos de fósforo insolubles para la planta, como son el fluor y la hidroxiapatitas, que son los mayores componentes de la roca fosfórica en formas disponibles para la planta como el monofosfato y fosfatodicalcico, por lo cual estos MO pasan a llamarse organismos solubilizadores de fósforo (SHARMA y PRASAD, 2003).

Las bacterias solubilizadoras de P (BSP), pueden solubilizar el P inorgánico fijado, dejándolo disponibles para las plantas, ésto por la excreción de ácidos orgánicos, a través de la disponibilidad de recursos como nitrógeno, carbono, sales, pH y temperatura. Una de las bacterias solubilizadoras de P es *Bacillus spp.* utilizada

en el crecimiento de plantas, la cual incrementa la toma de N, P, K y Fe (SAHIN *et al*, 2004).

Otras BSP como *Pseudomonas striata*, *B. polymixa* han mostrado su utilidad en el crecimiento y rendimiento de diferentes cultivos, también el uso de BSP junto a roca fosfórica, aumentan la disponibilidad de fósforo soluble en el suelo y en cultivos como arroz, trigo, sorgo, cacahuate y girasol (SHARMA y PRASAD, 2003).

Hongos, Actinomicetos y Bacterias de algunas especies como *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* y otras pueden disolver *in vitro* fosfatos insolubles en cantidades superiores a sus demandas nutricionales (ALEXANDER, 1961).

Algunas cepas del género *Bacillus*, son capaces de actuar sobre medios de cultivos que tengan P en formas inorgánicas, para transformar el P no asimilable en asimilable. Cuando sólo existen formas orgánicas, no es capaz de alcanzar las formas positivas de su solubilización (CASADO y FERNANDEZ, 1998).

#### **2.10 Mecanismos abióticos de la solubilización de P.**

En la solubilización de los fosfatos, hay formación de quelatos de calcio, hierro y aluminio con los ácidos orgánicos (láctico, glucónico, cítrico, málico y otros), producido por el metabolismo microbiano (Sperber, J. citado por REYES, 1991).

Estas sustancias quelatadas y ácidos inorgánicos como sulfhídrico, nítrico y carbónico, son considerados como otros mecanismos para la solubilización de fosfatos sin embargo la eficiencia y su contribución para el aumento del fósforo disponible en los suelos parece ser menor a la producción de ácidos orgánicos (ALEXANDER, 1961).

### 3 MATERIAL Y METODO.

#### 3.1 Material

Para el desarrollo de ésta investigación, se utilizaron diferentes medios de cultivos, equipos y materiales:

**3.1.1 Medios de cultivos utilizados.** Con el objetivo de aislar e identificar las cepas en estudio se utilizaron los siguientes medios: Agar P *Pseudomonas* base, Agar peptona (AP), Caldo peptona (CP), Agar nutritivo, Peptona-glucosa-extracto de levadura (PGY), AT salts, Agar y Caldo Pikovskaya (PVK), Agar papa dextrosa, King A, King B, Agar citrato Simmons, Tri sugar iron (TSI), Oxidación-fermentación, Agar almidón, Agar gelatina, MIO, Agar urea, LIA (ver composición en ANEXO 1 al 18).

**3.1.2 Equipos.** Para el desarrollo y mediciones de ensayos, además de la esterilización de los materiales y medios utilizados, se ocuparon los siguientes equipos: agitador orbital, autoclave, balanza analítica, balanza de precisión, horno de incubación, lupa, microscopio, pHmetro, refrigerador, cámara de incubación, microondas, espectrofotómetro Sequoia-Turner modelo 320, centrífuga, programa computacional Win-rizo, areafoliómetro, lámpara de Wood y contador de colonias.

**3.1.3 Otros materiales.** Otros materiales más simples pero imprescindibles para esta investigación son: algodón, matraces de 1000 mL, asa, tubos de ensayo, vasos precipitados, mechero, frascos de vidrio, elásticos, algodón, gasa, pipetas, pipetas automáticas, placas petri, probeta de 1000 y 100 mL, bolsas plásticas, pala, mortero, agua oxigenada, porta objeto, porta objeto excavado, cubre objeto, agua, cristal violeta, lugol, alcohol acetona, safranina.

Para la evaluación en macetas de bacterias en trigo, los materiales fueron los siguientes: macetas plásticas, bolsas de papel, regla, papel filtro, reactivo oxidasa, jeringa, semillas de trigo variedad Pandora, roca fosfórica Carolina del Norte,

superfosfato triple, salitre potásico, hidróxido de cal, suelo con bajo ppm de P-Olsen, tijeras, corta cartón.

### **3.2 Método**

Con el objetivo de aislar bacterias solubilizadoras de P (BSP), se recopilaron ejemplares arbustivos de un suelo extremadamente pobre en P y con poca intervención del hombre. Estas muestras de suelo fueron obtenidas en la comuna de Los Muermos, Región de Los Lagos, Chile.

**3.2.1 Obtención de muestras arbustivas.** Se recolectaron tres muestras de la zona radical de especies arbustivas silvestres. Éstas muestras seleccionadas fueron de: murra (*Rubus constrictus*), murra alemana (*R. ulmifolius*) y calafate (*Berberis microphylla*), las que presentaron un crecimiento exagerado.

Estas muestras una vez recolectadas, fueron guardadas en bolsas plásticas y fueron llevadas al laboratorio.

**3.2.2 Aislamiento de cepas bacterianas.** Al llevar las muestras de raíces junto con el suelo al laboratorio, se sacaron de las bolsas y se procedió a manipularlas.

A las raíces de cada especie se le dieron suaves golpes bajo el agua para extraer el suelo sobrante y se lavaron con cuidado para conservar el suelo adherido a su superficie. Para esto se ocupó agua destilada estéril.

A continuación, se maceraron las raíces junto al suelo adherido y se procedió a pesar 10 g, para ser disuelto en 90 mL de agua destilada estéril. Se homogeneizó esta muestra y se hizo diluciones seriadas con 1 mL y se le agregaron 9 mL de agua destilada, hasta llegar a la dilución  $10^{-3}$ . Se sembró individualmente la muestra y las diluciones en agar P *Pseudomona* base, agar nutritivo y PGY, con un asa de siembra. Luego se incubó en un horno a una temperatura de 28 °C durante 48 h.

Posteriormente se seleccionaron las diferentes colonias obtenidas y fueron traspasadas a un medio mínimo, AT salts, para ser purificadas. Se incubaron en un

horno a 28°C durante 48 h o hasta que se vieran crecimiento de colonias. Si el cultivo no hubiese estado del todo puro, se procedió a esta misma técnica hasta obtener un cultivo puro (SHEKHAR, 1999).

**3.2.3 Prueba de solubilización biológica de P.** De un cultivo puro se extrajo una colonia y se sembró en el medio agar PVK, para determinar si se forma un halo alrededor de la colonia, acción que presentan las BSP en este medio y se incubó en un horno a 28°C hasta los 14 días.

$$I.S. = \frac{\text{diametro} \cdot \text{colonia} + \text{diametro} \cdot \text{halo}}{\text{diametro} \cdot \text{colonia}}$$

Las muestras positivas a ésta prueba fueron seleccionadas, se midió el Índice de solubilización (I.S.) y las cepas con los 10 resultados más altos, fueron seleccionados nuevamente para realizar la misma prueba pero en forma más homogénea. El diámetro del halo, se calculó, restando el diámetro de la colonia al diámetro total del halo.

Se seleccionaron de las diez mejores cepas, una colonia y se inoculó en 50 mL de CP, esto se llevó a un agitador orbital a 100 rpm y a 26°C durante 10 h. Luego de esto se midió la absorbancia, y se igualaron todas a 0,3 de absorbancia en forma inocua y con sus respectivas diluciones, para inocular con 10 µL (una gota) al agar PVK con un indicador, azul de bromotimol, para darle más contraste y se incubó en un horno a 28°C. Se midió el diámetro del halo mas la colonia y el diámetro de la colonia para obtener así la medida del I.S., todos los días por 7 días (EDI-PREMONO et al, 1996). Con cada cepa se realizaron tres repeticiones.

**3.2.4 Efecto sobre el pH en medio líquido.** Para la medición de pH, primero se homogeneizó las muestras de cada cepa en CP con una absorbancia de 0,3 y se inoculó con 1000µL a un matraz con 100 mL de caldo PVK. Los matraces fueron puestos en un agitador orbital a 100 rpm, con 26°C y se realizó la medición de pH extrayendo 5 mL de cada matraz, todos los días por 7 días. Se realizaron 3 repeticiones para cada cepa.

**3.2.5 Medición de unidades formadoras de colonia (ufc/mL).** De las cepas bacterianas, se extrajo con el asa el inóculo y se llevó al CP para luego ser incubado en un agitador a 26°C a 100 rpm, durante 10 h. Pasado este tiempo se procedió a medir con un espectrofotómetro la absorbancia y se dejaron todas las capas a igual concentración de 0,3 y con absorbancia de 0,6 para las bacterias que se utilizaron en la inoculación en el trigo, diluyendo con agua destilada. Una vez homogéneas las cepas, se sembró con un rastrillo un inóculo con 0,1 mL en AP, para realizar recuento de unidades formadoras de colonia.

**3.2.6 Clasificación de las BSP.** Se realizaron diferentes pruebas para determinar el género y especie de las 10 cepas de bacterias seleccionadas:

- Tinción de Gram y morfología celular: La tinción de Gram es la más importante de las tinciones diferenciales. Las células Gram (+) retienen el cristal violeta cuando se tratan con etanol. Las Gram (-) no lo retienen y se tiñen entonces del color rojo de la safranina. Diferencias en la estructura de la pared son las responsables de este comportamiento. Además éste proceso permite establecer formas celulares.
- Motilidad: El desplazamiento de las bacterias es consecuencia de la presencia de flagelos. El movimiento puede observarse en preparación en fresco con el microscopio de contraste de fase. Debe distinguirse del movimiento Browniano debido a las corrientes en la preparación.
- Prueba de la catalasa: La catalasa es una enzima que protege a las células frente al peróxido de hidrógeno producido en el metabolismo del oxígeno. Cataliza la formación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. La actividad catalasa se detecta añadiendo unas gotas de peróxido de hidrógeno (3%) sobre colonias en medio que no sea de agar sangre (daría falsos positivos). La producción de burbujas indica la presencia de la enzima.

Es útil para distinguir *Streptococcus* (negativa) de *Staphylococcus* (positiva) y *Clostridium* (negativa) de *Bacillus* (positiva).

- Prueba de la oxidasa: La presencia de citocromo C oxidasa en la cadena de transporte de electrones puede detectarse utilizando un aceptor de electrones artificial p-fenilendiamina. Este test se usa para diferenciar *Pseudomonas* (positivo) de *Enterobacterias* (negativo). Se utiliza como reactivo p-fenilendiamina al 1% en agua, que se coloca en un papel de filtro, posteriormente, con un asa que no sea de hierro (daría falsos positivos), se coge una colonia de 24 h y se extiende sobre el papel mojado. Es positiva cuando aparece un color azul en la zona de depósito de la bacteria.
- Producción de pigmentos: En la identificación de *Pseudomonas* se utiliza la producción de diversos pigmentos como prueba en la identificación. Se utilizan medios de cultivo especiales que permiten apreciar la producción de piocianina y fluoresceína. El primero produce una coloración azulada en el medio King A y se puede extraer con cloroformo. El segundo produce una coloración verde manzana bajo la lámpara de Wood, en el medio King B.
- Utilización del Citrato como fuente de carbono: Es uno de los test del IMVIC usado para diferenciar Enterobacterias. Hay microorganismos capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono produciendo alcalinidad. La prueba se realiza en tubos de medio sólido muy inclinados, ya que la utilización se produce sólo en condiciones aerobias, que contienen un indicador de pH que vira de color verde a azul al alcalinizarse el medio.
- TSI (tri sugar iron): El TSI es un medio diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la identificación de la producción de H<sub>2</sub>S.
- Oxidación – fermentación (O/F): El medio de Hugh-Leifson es una base sin carbohidratos, a la que se puede añadir después de esterilizarlo cualquier azúcar esterilizado previamente por filtración. Cuando se habla de esta prueba sin especificar nada, hay que suponer que el test se ha hecho con glucosa, así, cuando se dice que



un microorganismo es oxidante o fermentador se sobreentiende que lo es con respecto al metabolismo de la glucosa.

La prueba se realiza en dos tubos con medios semisólido y rectos, que inicialmente son de color verde. Se inoculan por picadura en el centro del tubo y uno de ellos se recubre con parafina líquida estéril (que impide el contacto del medio con el oxígeno atmosférico).

El indicador en medio ácido (el metabolismo de los azúcares produce ácidos, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno) es de color amarillo. Si el microorganismo es únicamente oxidante, después de la incubación sólo estará amarillo el medio sin cubrir con parafina, si es oxidante y fermentador, en los dos tubos el color virará a amarillo y si sólo puede utilizar el azúcar cuando no hay oxígeno sería fermentador (tubo con parafina amarillo).

- Hidrólisis del almidón: Los polisacáridos, como el almidón son demasiado largos para ser transportados al interior de la célula. Los microorganismos excretan amilasas que hidrolizan esos polímeros hasta oligosacáridos o monosacáridos que pueden usarse como sustratos para crecer.

La hidrólisis de almidón es analizada en medios conteniendo éste compuesto. Después de incubar se inundan con lugol que al unirse con el almidón intacto forma un complejo púrpura.

- Licuación de la gelatina: La mayoría de los polímeros son demasiado grandes para ser transportados dentro de las células. Las bacterias excretan enzimas extracelulares que hidrolizan esos polímeros transportando al interior de la célula en monómeros que les sirven para crecer.

La producción de proteasas es evaluada por incorporación de una proteína (gelatina o caseína) en un medio sólido. Luego se inunda con ácido que precipita la proteína no hidrolizada.

- Reducción del nitrato: Reducción de Nitrato a Nitrito: Algunas bacterias pueden usar nitratos como aceptor final de electrones en la respiración. el nitrato puede ser reducido a nitrito. Las *Enterobacterias* y *Pseudomonas* son usualmente positivos. Las bacterias se inoculan en medios conteniendo nitrato potásico. El nitrito procedente de la reducción de células puede detectarse añadiendo alfa-naftilamina y ácido sulfanílico produciéndose un color rosa-rojo.

Reducción de nitrato hasta nitrógeno gaseoso: Se puede saber si el nitrato puede haberse reducido más que hasta nitrito produciéndose nitrógeno gaseoso. Si al añadir zinc en polvo no aparece color rojo es que no queda nitrato porque se ha reducido a gas (desnitrificación).

- Prueba de la ureasa: Este enzima hidroliza la urea ( $H_2N-CO-NH_2$ ) y origina amonio lo que producirá un incremento del pH que puede detectarse con un indicador.

Las bacterias se inoculan en un medio con glucosa-peptona y urea al 2%. Como indicador de pH se utiliza rojo fenol.

- Prueba MIO (Motility-Indole-Ornithine ó Motilidad-Indol-Ornitina): Esta prueba bioquímica permite identificar bacterias de acuerdo a su motilidad a la reacción de Indol a la descarboxilación de la ornitina.
- Prueba LIA (Lysine Iron Agar ó Agar Lisina Hierro): Prueba que permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de  $S_2H$  y es más sensible que el TSI para la detección de éste gas.

**3.2.7 Evaluación de cepas en trigo en macetas.** Se obtuvo suelo de un bosque a la salida norte de Valdivia y se realizó un análisis de suelo en el laboratorio de suelos de la Universidad Austral de Chile (ver CUADRO 2), en la cual el P de suelo es extremadamente bajo, (2,3 ppm P-Olsen). Éste fue cernido para homogeneizar el suelo y se llenaron macetas de plástico negro. Luego se mezcló el suelo con 20 g hidróxido

de calcio por maceta para llegar de un pH de 5,2 a 6 ya que el pH que necesita el trigo es de alrededor de 5,6 pero se subió un poco más para que no haya problemas con el aluminio intercambiable. Se agregó también 2,7 g salitre potásico por maceta en la siembra y nuevamente se le agregó en la macolla, para suplir 2 nutrientes, el nitrógeno y el potasio.

A las macetas con roca fosfórica se le agregaron 11,2 g de roca fosfórica Carolina del Norte por maceta calculado para llegar a 17 ppm y las macetas sin roca fosfórica no se le agregó ningún tipo de fertilizante fosforado. Para el tratamiento con superfosfato triple se le agrego 7,3 g por maceta. Para cada tratamiento hubo cuatro repeticiones y como se realizaran tres cortes, en cada tratamiento hubo un total de 12 macetas.

Para hacer una evaluación de las cepas solubilizadoras de fósforo en trigo, se procedió a seleccionar sólo 3 de ellas con alto I.S.

**CUADRO 2. Análisis químico de un suelo Trumao de la comuna de Valdivia, de la Región de los Ríos, utilizado para la evaluación del trigo en macetas.**

pH en agua (1:2,5)	5,2
pH CaCl <sub>2</sub> 0,01M	4,6
Mat Org (%)	12,1
N-Mineral (mg/kg)	9,1
Fosforo Olsen (mg/kg)	2,3
Potasio interc (mg/kg)	98
Sodio interc (cmol+/kg)	0,18
Calcio interc (cmol+/kg)	0,91
Magnesio interc (cmol+/kg)	0,88
Suma bases (cmol+/kg)	2,22
Aluminio interc (cmol+/kg)	0,9
CICE (cmol+/kg)	3,12
Saturacion de Al (%)	28,8
Aluminio extractable (mg/kg)	1091

FUENTE: Laboratorio de suelos, Universidad Austral de Chile.

Se utilizaron dos niveles de P, con roca fosfórica y sin roca fosfórica, para las tres cepas seleccionadas. También se probaron dos testigos sin cepas y con los 2

niveles de roca fosfórica Carolina del Norte. Además, otro testigo con superfosfato triple y sin inóculo bacteriano (Cuadro 3).

Estas cepas bacterianas seleccionadas fueron: MN70, MN108 y MN139, además se utilizó una cepa fijadora de N atmosférico, JS C5 (*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*) obtenida de la rizósfera de Murra, por Juan Silva, para ser evaluada junto a la cepa MN139.

Semillas de trigo de la variedad Pandora, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% y se agitó durante 30 min, luego se realizaron dos enjuagues con agua destilada durante 10 min. Estas semillas fueron sembradas en macetas de plástico negro. En cada maceta se sembró 10 semillas de trigo, para llegar a una densidad de siembra equivalente a 400 plantas por m<sup>2</sup>, ya que la siembra se realizó después de la fecha normal de siembra. En cada semilla sembrada se le agregaron 4 cápsulas que contienen las diferentes bacterias a utilizar: cepa MN70; cepa MN108; cepa MN139 y cepa MN139 mas la cepa JSC5.

**CUADRO 3. Código de cada tratamiento, bacteria y fertilización fosforada.**

<b>CODIGO</b>	<b>BACTERIA</b>	<b>FERTILIZACION FOSFORADA</b>
CONTROL	Sin cepa bacteriana	Superfosfato triple
C0 RF1	Sin cepa bacteriana	Con roca fosfórica
C0 RF0	Sin cepa bacteriana	Sin adición de fertilizante fosforado
C70 RF1	Cepa MN70	Con roca fosfórica
C70 RF0	Cepa MN70	Sin adición de fertilizante fosforado
C108 RF1	Cepa MN108	Con roca fosfórica
C108 RF0	Cepa MN108	Sin adición de fertilizante fosforado
C139 RF1	Cepa MN139	Con roca fosfórica
C139 RF0	Cepa MN139	Sin adición de fertilizante fosforado
C200 RF1	Cepa MN139 y JS C5	Con roca fosfórica
C200 RF0	Cepa MN139 y JS C5	Sin adición de fertilizante fosforado

Cuadro verde: muestra tres testigos

Cada 18 días aproximadamente se agregó por medio de riego la bacteria diluida en agua destilada, con una concentración de  $10^{-6}$  ufc, hasta llegar a floración. Obteniendo un total de cuatro riegos con suspensión bacteriana durante el período del ensayo.

El ensayo se inició el 29 de enero del año 2007 (siembra), la primera cosecha se realizó el 15 de febrero (estado de tres hojas), la segunda el 5 de abril (estado de floración) y la última el 15 de junio del mismo año (estado de grano seco).

Para concluir el ensayo en macetas, se procedió a medir el P del suelo de cada tratamiento efectuado.

**3.2.8 Encapsulación de bacterias utilizadas para la evaluación del trigo en macetas.** Las bacterias MN70, MN108, MN139 y JSC5 se sembraron en matraces con caldo peptona y se incubaron durante 24 h a 25°C y 100 rpm, luego se centrifugaron a 9000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se eliminó y se trabajó con los pellets que fueron de 12 mL. A la vez se preparó 138 mL de CP con 2% de alginato y se agregó 10% de almidón, siempre en forma estéril y se vació acá los 12 mL de pellet, se agitó bien y luego se procedió a encapsular. Esta solución final, pasó a través de mangueras hasta el encapsulador, en donde caían gotas a una solución estéril de  $\text{CaCl}_2$  al 0,1 M, y al estar agitándose estas gotas se polimerizaron hasta formar las cápsulas.

**3.2.9 Evaluación del ensayo en macetas.** Se realizaron tres cosechas de trigo, en el estado de 3 hojas, de floración y grano seco, para cada una de ellas, se separó la parte aérea de las raíces y se lavaron las raíces.

En la primera cosecha, se midió de la parte aérea:

Área foliar: se midió pasando las hojas por un determinador de área foliar, entregando las mediciones en  $\text{cm}^2$ .

Materia seca: se dejaron las muestras en bolsas de papel en un horno a 48°C durante 2 días, este mismo procedimiento se aplicó para todos los pesos secos.

Para la parte de raíces se midió:

Largo de raíces, diámetro de raíces y superficie de raíces: largo (cm), diámetro (mm) y superficie de raíces (cm<sup>2</sup>) se midió dejando las raíces separadas en un escanner y luego procesándolas en el programa Win-Rhizo.

Materia seca: utilizando el mismo procedimiento que materia seca aérea.

En la segunda se midieron los mismos parámetros para las raíces, y para la parte aérea se midió: área foliar, peso seco de espigas, peso seco aéreo.

En la tercera se midió en la parte aérea: altura de plantas, número de espigas, peso seco de espigas sin granos, peso seco de espigas, número de granos, peso de granos y peso de los 1000 granos. En la parte de raíces se evaluó: materia seca.

**3.2.10 Análisis estadístico.** En la evaluación de trigos en macetas se aplicó un diseño completo al azar, con 11 tratamientos y 4 repeticiones. Para analizar los datos se usó el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1. Para la homogeneidad de varianza se aplicó el test de Hartley.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar diferencias estadísticas, si esta prueba fue positiva se continuó con la prueba de Tukey con un 5% de significancia para detectar entre los distintos tratamientos estas diferencias estadísticamente significativas.

## 4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

### 4.1 Obtención y selección de bacterias solubilizadoras de P de la rizósfera y raíces de arbustos.

De las tres muestras obtenidas de un suelo Trumao de la Región de Los Lagos deficiente en P, se logró aislar 155 cepas. De la rizósfera y raíces de calafate (*B. microphylla*) se obtuvo un 33% de bacterias solubilizadoras de P (BSP) de 41 bacterias aisladas. En el caso de la murra (*R. constrictus*), éste porcentaje fue de un 24%, de 66 bacterias totales y en la murra alemana (*R. ulmifolius*) se encuentra el mayor porcentaje de BSP, con 57% de 48 bacterias.

Los resultados de este trabajo son comparables a los informados por KHAN *et al* (2006), en el sentido de que en diferentes cultivos se han encontrado asociaciones con microorganismos rizosféricos solubilizadores de P, siempre que las condiciones del suelo sean deficientes de P.

Como se puede observar en el Cuadro 4, la mayoría de las cepas que obtuvieron un mayor índice de solubilización (I.S.), en agar PVK a los 7 días de incubadas, pertenecen al género *Pseudomonas*. Además, la mayoría fueron obtenidas de la especie *R. ulmifolius*.

Al igual que las BSP obtenidas por SHREINER *et al* (1997), los recuentos de *Pseudomonas* fueron mayores. Estas cepas también fueron obtenidas de un suelo con bajos niveles de P.

**CUADRO 4. Nombre científico de cepas solubilizadoras de P seleccionadas y su procedencia.**

<b>CEPA</b>	<b>GENERO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
MN 4	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>Rubus constrictus</i>
MN 70	<i>Pseudomonas</i>	<i>diminuta</i>	<i>Berberis microphylla</i>
MN 106	<i>Serratia</i>	<i>rubidea</i>	<i>R. ulmifolius</i>
MN 108	<i>K.</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>R. ulmifolius</i>
MN 110	<i>S.</i>	<i>marcescens</i>	<i>R. ulmifolius</i>
MN 113	<i>P.</i>	<i>stutzeri</i>	<i>R. ulmifolius</i>
MN 115	<i>P.</i>	<i>syringae</i>	<i>R. ulmifolius</i>
MN 116	<i>P.</i>	<i>sp.</i>	<i>R. ulmifolius</i>
MN 125	<i>P.</i>	<i>diminuta</i>	<i>R. ulmifolius</i>
MN 139	<i>P.</i>	<i>putida var B</i>	<i>R. ulmifolius</i>

#### **4.2 Determinación del Índice de Solubilización (I.S.) de P de los diez mejores aislamientos.**

Tras sembrar cada cepa aislada en agar PVK, se procedió a medir el diámetro de la colonia y el halo de solubilización de P cuyos resultados se muestran en la Figura 1. El I.S. se observa en el Cuadro 5. Éste muestra las bacterias con mayor I.S. Entre ellas, las que obtuvieron los más altos resultados fueron la cepa MN108 del género *Klebsiella* y MN116 con MN139, del género *Pseudomonas*.

Al igual que los resultados obtenidos por RIZOBACTER (2004), el grupo de las bacterias *Pseudomonas*, son las que tienen mayor capacidad de solubilización de P, superando a otros géneros de bacterias en un 20% en condiciones *in vitro*.

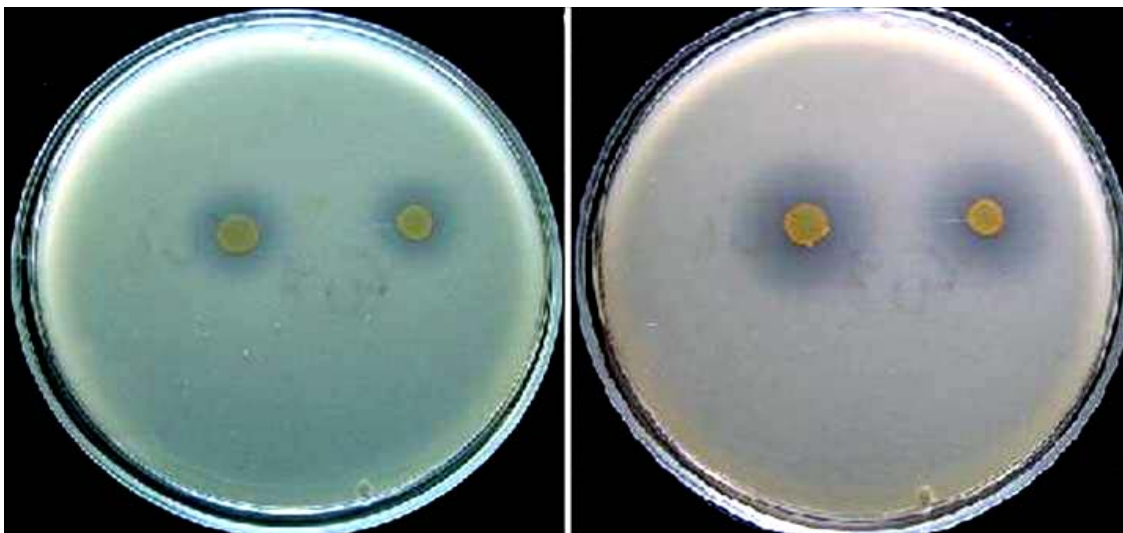


**CUADRO 5. Promedio de tres repeticiones del I.S. de las diez cepas seleccionadas.**

CEPA	MN	MN	MN	MN	MN	MN	MN	MN	MN	MN
	4	70	106	108	110	113	115	116	125	139
día 1	1,52	1,51	1,31	1,85	1,39	1,28	1,52	1,60	1,54	1,34
día 2	1,58	1,79	1,55	1,90	1,49	1,64	2,05	2,02	1,75	1,93
día 3	1,80	1,95	1,74	2,22	1,68	1,68	2,27	2,24	2,02	2,15
día 4	1,99	2,16	1,87	2,54	1,79	1,94	2,42	2,35	2,19	2,41
día 5	2,17	2,33	1,96	3,12	1,89	2,14	2,52	2,46	2,39	2,66
día 6	2,28	2,53	2,03	2,90	2,02	2,18	2,60	2,55	2,50	2,72
día 7	2,46	2,68	2,09	3,33	2,05	2,30	2,66	3,04	2,62	2,92

Los resultados obtenidos por KUMAR y NARULA (1999), en especies de bacterias aisladas de trigo como *Azotobacter chroococcum*, dieron índices de solubilización entre 2 a 2,1 con cepas mutantes y solo 1,3 a 2,3 con las cepas parentales. Es interesante destacar que las cepas aisladas en esta investigación, obtuvieron mayores resultados.

Esto se debe a que al aislar cepas de trigo, el suelo que sustenta éste cultivo, debería estar con altas cantidades de P soluble, al contrario de las cepas obtenidas de arbustos donde su sustento son suelos pobres en P, ya que no se cultivan. Por tanto, es en suelos pobres en P donde las BSP tienen mayor capacidad de solubilización. Al contrario, bacterias que se encuentran en suelos con fósforo soluble, o con aportes de fertilizante solubles de P pierden ésta capacidad de solubilización, lo que se conoce como el efecto Feed-Back (MICANOVA y NOVAKOVA, 2002).

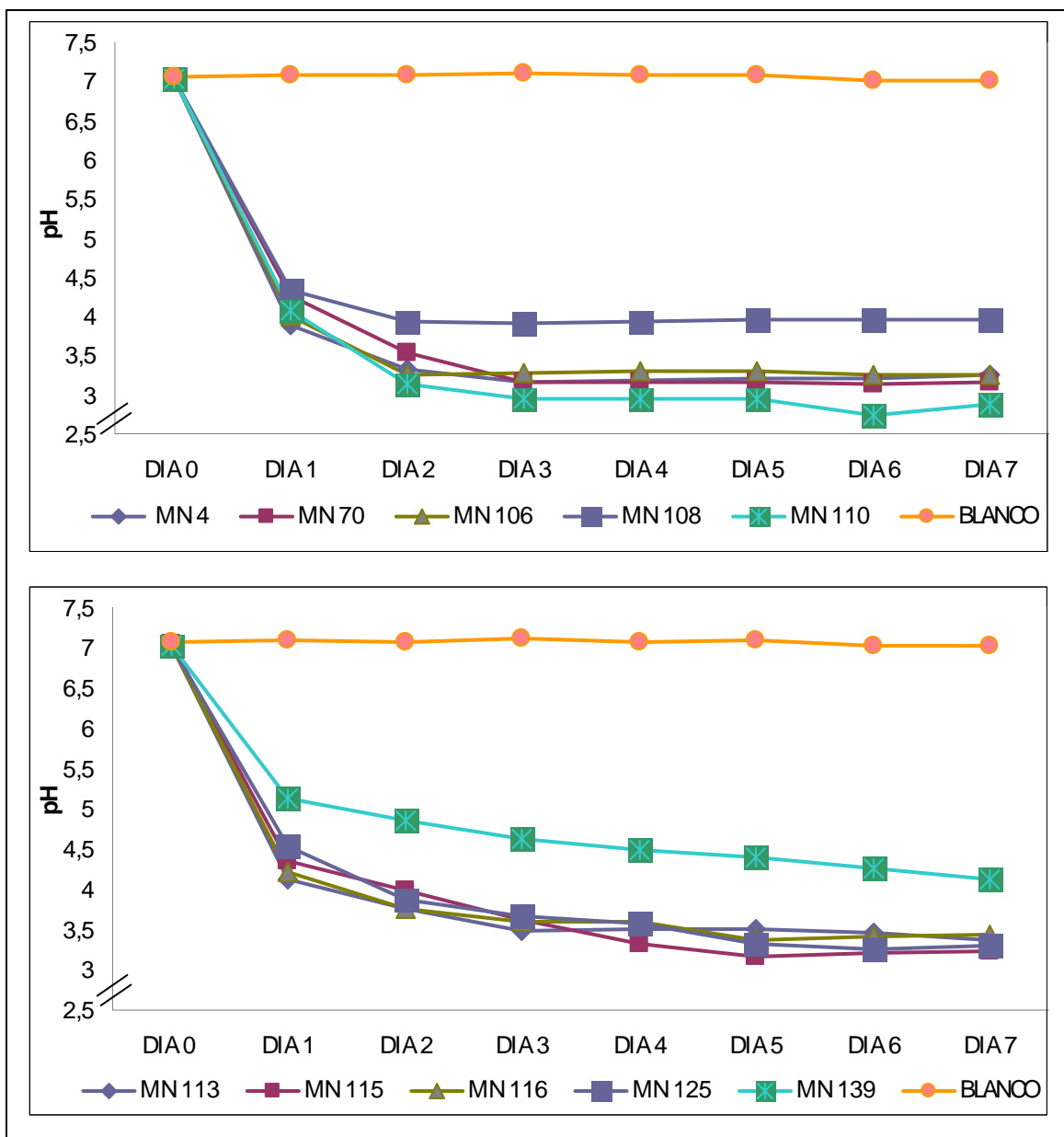


**FIGURA 1.** Placas Petri que ilustran dos colonias bacterianas solubilizadoras de P. Es posible apreciar un halo de solubilización alrededor de cada colonia. Prueba realizada en el medio agar PVK. Foto de la izquierda corresponde al primer día, imagen derecha, séptimo día.

#### **4.3 Determinación del cambio de pH en caldo PVK por acción de diez cepas seleccionadas con capacidad de solubilizar P.**

La Figura 2 muestra las curvas de variación de pH por acción de BSP, durante los 7 días de incubación en el caldo PVK, en donde encontramos pH de 2,9 a 4,1 al final del período de incubación.

Se puede apreciar del total de las cepas seleccionadas, que la cepa MN110 presentó el pH más ácido, obteniendo los menores índices de solubilización como se muestra en el Cuadro 5. En cambio las cepas MN108 y MN139 fueron las que mantuvieron el medio con valores de pH más altos a las demás bacterias y obteniendo los mayores índices de solubilización.



**FIGURA 2. Variación de pH en caldo PVK durante siete días de incubación, para diez cepas solubilizadoras de P y un blanco (sin bacteria).**

Según ALAM *et al* (2002), los resultados obtenidos del I.S. a los siete días de incubación, no tuvieron relación con el pH, ya que los valores más altos

obtuvieron diferentes rangos de pH, desde 3,3 a 4,3, al igual que los obtenidos de los menores I.S., con rangos de 3.3 a 4 de pH. Sin embargo, resultados obtenidos por GAIND y GAUR, (1989), establecieron que las bacterias que presentaban una mayor solubilización a los siete días de incubación, no fueron las que obtuvieron el pH más bajo, sino aquellas que presentaban un pH alrededor de 4. Al comparar los resultados con los obtenidos en ésta tesis, podemos observar que los mayores I.S también los encontramos con pH alrededor de los 4.

En consecuencia, se puede inferir que depende del tipo de ácido que produzca cada tipo de bacteria, para obtener la potencialidad de solubilizar P y no de su poder de acidificación que tenga el ácido que produzca ésta.

Ácidos producidos por BSP y que tienen la capacidad de solubilizar P insoluble son: ácido oxálico, ácido cítrico, ácido glucónico, entre otros ALAM *et al* (2002).

#### **4.4 Recuento de unidades formadoras de colonia por mL (ufc/mL) en CP.**

Esta prueba se realizó para obtener las densidades bacterianas medidas en ufc por mL, en caldo peptona a dos concentraciones ópticas. Para las pruebas *in vitro* - las cuales fueron medición del I.S. y pH- se utilizaron densidades ópticas de 0,3, y para la evaluación de las bacterias en trigo (encapsulación de cepas), las densidades ópticas fueron de 0,6.

**CUADRO 6. Recuento de ufc/mL, de diez BSP seleccionadas a densidad óptica de 0,3.**

<b>CEPA</b>	<b>GENERO</b>	<b>UFC (ufc/ml)</b>
<b>MN 4</b>	<i>Klebsiella</i>	$7,5 \times 10^{11}$
<b>MN 70</b>	<i>Pseudomonas</i>	$2,1 \times 10^{10}$
<b>MN 106</b>	<i>Serratia</i>	$1,01 \times 10^{12}$
<b>MN 108</b>	<i>Klebsiella</i>	$1,12 \times 10^{11}$
<b>MN 110</b>	<i>Serratia</i>	$9,6 \times 10^{10}$
<b>MN 113</b>	<i>Pseudomonas</i>	$1,42 \times 10^9$
<b>MN 115</b>	<i>Pseudomonas</i>	$7,2 \times 10^8$
<b>MN 116</b>	<i>Pseudomonas</i>	$1,36 \times 10^9$
<b>MN 125</b>	<i>Pseudomonas</i>	$1,51 \times 10^{10}$
<b>MN 139</b>	<i>Pseudomonas</i>	$3,2 \times 10^8$

En el recuento de ufc/mL, el género *Klebsiella* y *Serratia* que pertenece a la familia de las Enterobacterias presenta los mayores valores que las del género *Pseudomonas*, Cuadro 6.

**CUADRO 7. Recuento de ufc/mL, a densidad óptica de 0,6.**

<b>CEPA</b>	<b>GENERO</b>	<b>UFC (ufc/ml)</b>
<b>MN 70</b>	<i>Pseudomonas</i>	$1,17 \times 10^{10}$
<b>MN 108</b>	<i>Klebsiella</i>	$6,4 \times 10^{11}$
<b>MN 139</b>	<i>Pseudomonas</i>	$6,3 \times 10^9$

Se puede observar en el Cuadro 7, un débil aumento de las ufc/mL, al aumentar la densidad óptica a 0,6. Esto incide en el aporte de estas bacterias al ser inoculadas al suelo, ya que al aumentar la densidad de bacterias, hay una mayor posibilidad de colonizar la raíz de las plantas.

Según KHALID *et al* (2004), éstos recuentos bacterianos son comúnmente encontrados para densidades ópticas de 0,5 a 0,6.

Para una buena calidad de inoculante, la concentración bacteriana es muy importante. En Argentina, ésta es exigida y es de  $10^9$  ufc/mL, y a la fecha de vencimiento debería llegar a las  $10^8$  (MADDONNI *et al*, 2004a). La cantidad suministrada del inóculo debe ser mayor a las densidades naturalizadas que existen en el suelo para que así tengan la capacidad de competir efectivamente con las cepas existentes en él.

También existe una normativa para los biofertilizantes solubilizadores de P. En India el conteo de células debe ser de  $10^7$ /g de sustrato, ausencia de contaminantes a una dilución de  $10^5$ , zona de solubilización mínima de 10 mm, pH de 6,5 a 7,5, entre otras FAO (2007).

#### **4.5 Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación taxonómica de cepas bacterianas.**

Teniendo las diez cepas seleccionadas, se procedió a clasificarlas taxonomicamente, a través de pruebas morfológicas, tintoriales y bioquímicas. Las que se describen en los puntos que continúan.

##### **4.5.1 Pruebas morfológicas y tintoriales.**

Con la tinción de Gram, se pudo observar la morfología y características de la pared celular. Con la prueba de la gota pendiente se pudo observar si la bacteria a identificar poseía motilidad a través de la presencia de flagelos. Los datos de estas dos pruebas se presentan detalladamente en el Cuadro 8. En él, podemos observar que el total de las cepas aisladas son Gram negativas, y tienen forma bacilar. La mayoría son móviles, a excepción de las cepas MN4 y MN108, las cuales pertenecen al género *Klebsiella*.

**CUADRO 8. Clasificación de las diez bacterias seleccionadas según Gram, morfología celular y motilidad.**

Nº Bacteria	Tinción de		
	Gram.	Morfología celular.	Motilidad
<b>MN4</b>	-	Bacilos	no móvil
<b>MN70</b>	-	Bacilos	Móvil
<b>MN106</b>	-	Bacilos	Móvil
<b>MN108</b>	-	Bacilos	no móvil
<b>MN110</b>	-	Bacilos	Móvil
<b>MN113</b>	-	Bacilos	Móvil
<b>MN115</b>	-	Bacilos	Móvil
<b>MN116</b>	-	Bacilos	Móvil
<b>MN125</b>	-	Bacilos	Móvil
<b>MN139</b>	-	Bacilos	Móvil

#### 4.5.2 Pruebas bioquímicas para la determinación de *Pseudomonas*.

Uno de los géneros más frecuentes encontrado en la rizósfera de diferentes plantas, son bacterias del género *Pseudomonas* ALEXANDER (1961).

Según el Cuadro 9, las cepas MN70, MN113, MN115, MN125 y MN139, pertenecen al género *Pseudomonas*, ya que según BERGEY (2002), en la prueba O/F, son +/-, lo que quiere decir que son aerobios estrictos. En el caso de la cepa MN106 y MN110, no coinciden con este género ya que en la prueba específica para *Pseudomonas* de producción de pigmentos en Agar P y Agar F, se obtuvieron resultados negativos. Las cepas MN4 y MN70 tampoco pertenecen a éste género ya que dió negativo en la prueba de producción de pigmentos en Agar F y la prueba de utilización del citrato. Además las cepas MN4 y MN108, dieron en la prueba O/F +/+.

**CUADRO 9. Pruebas bioquímicas para determinar si las cepas pertenecen al género *Pseudomonas*.**

<b>Pruebas bioquímicas</b>	<b>Cepa MN4</b>	<b>Cepa MN70</b>	<b>Cepa MN106</b>	<b>Cepa MN108</b>	<b>Cepa MN110</b>	<b>Cepa MN113</b>	<b>Cepa MN115</b>	<b>Cepa MN116</b>	<b>Cepa MN125</b>	<b>Cepa MN139</b>
<b>Test de la Catalasa.</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Test de la Oxidasa.</b>	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<b>Prod. De pigmentos en Agar P.</b>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>Prod. De pigmentos en Agar F.</b>	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<b>Utilización del Citrato.</b>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>Prueba O/F.</b>	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
<b>Utilización de la Urea.</b>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Prueba O/F (Oxidación-fermentación): +/+ (son positivas para la fermentación y oxidación) y +/- (es positiva en la oxidación y negativa a la fermentación).



Al realizar las diferentes pruebas bioquímicas, se puede concluir que las cepas MN70, MN113, MN115, MN116, MN125 y MN139 son del género *Pseudomonas* (Cuadro 9). Por lo tanto se realizó otras pruebas bioquímicas, con el propósito de identificar la especie de las cepas del género *Pseudomonas*, las que se observan en el Cuadro 10.

**CUADRO 10. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas del género *Pseudomonas*, para determinar su especie.**

Pruebas bioquímicas	70	113	115	116	125	139
Crecimiento a 4°C	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 40°C	-	-	-	-	-	-
Licuefacción de la Gelatina	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis del Almidón	-	+	-	+	-	-
Reducción del Nitrato	-	+	+	-	-	+

Según el Cuadro 10, con las pruebas analizadas para el grupo de cepas del género *Pseudomonas*, la cepa MN70, corresponde a la especie *diminuta*; la cepa MN113, a la especie *stutzeri*, la cepa MN115, a la especie *syringae*. En el caso de la cepa MN116, no se pudo reconocer la especie por lo que quedo como *spp*. La cepa MN125, de especie *diminuta* y la cepa 139, de especie *putida var B*. Como se puede observar esta última cepa y la MN115 dieron los mismos resultados en las pruebas observadas en el Cuadro 10, sin embargo, en las pruebas mostradas en el Cuadro 9, la prueba de la oxidasa dió diferente lo que marcó la diferencia en la identificación.

#### **4.5.3 Pruebas bioquímicas para la identificación de Enterobacterias.**

De acuerdo a KHALID *et al*, (2004) y SALANTUR *et al* (2006), la mayoría de los géneros de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacterias, las que se encuentran en la rizósfera de plantas y son bacterias promotoras del crecimiento.

Según los resultados obtenidos, en el Cuadro 11, las bacterias MN4, MN106, MN108 y MN110, pertenecen a la familia de las Enterobacterias, y a los géneros *Klebsiella* y *Serratia*. Al género *Klebsiella*, pertenecen la cepa MN4 y MN108 ya que produjo gas en la prueba del TSI y además la prueba de la Ornitina es negativa. Al género *Serratia* le corresponden las pruebas Ornitina positiva y glucosa fermentadora.

**CUADRO 11. Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas MN4, MN106, MN108 y MN110, para determinar si pertenecen a la familia de las Enterobacterias.**

	<b>TSI</b>	<b>INDOL</b>	<b>ORNITINA</b>	<b>LIA</b>
MN 4	AA (GAS)	-	-	KK - +
MN 106	KA	-	+	KK - -
MN 108	KA (GAS)	-	-	KK - -
MN 110	KA	-	+	KK - -

TSI: AA (glucosa, lactosa y sacarosa fermentada), KA (glucosa fermentada) y GAS (producción de gas). LIA: KK+-(desaminación de lisina positiva, descarboxilación de lisina positiva, producción de H<sub>2</sub>S), KK--(desaminación de lisina positiva, descarboxilación de lisina positiva).

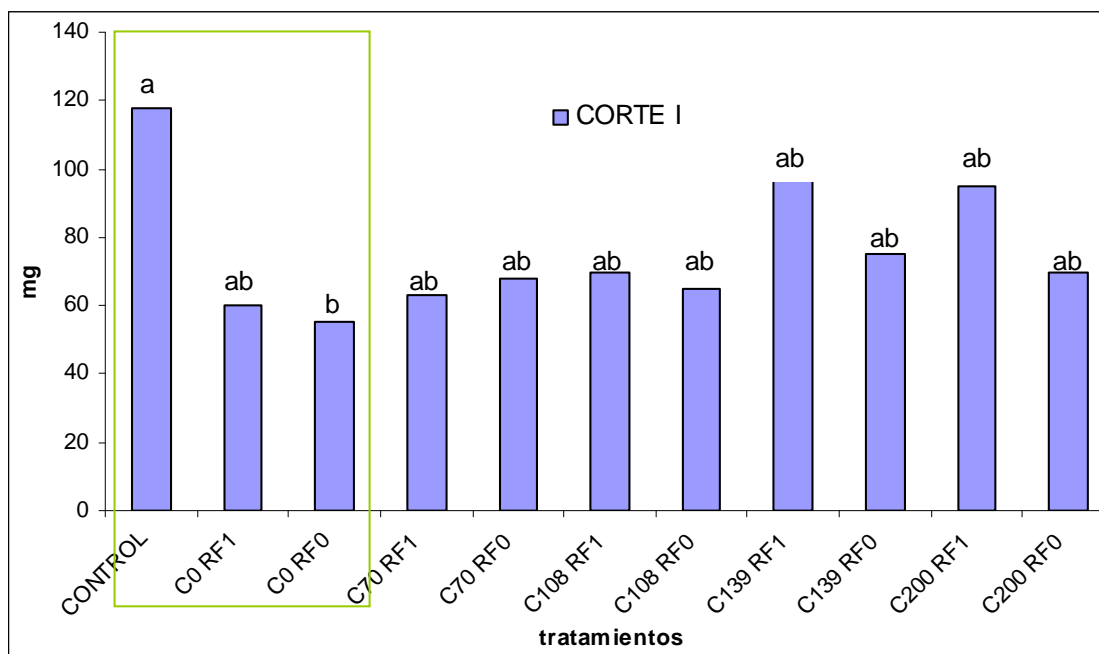
Además de estos resultados obtenidos y según los anteriores, se obtuvo también la especie de éstas bacterias, siendo la cepa MN4, *K. pneumoniae*; MN106, *S. rubidea*; MN108, *K. pneumoniae* y MN110 corresponde a *S. marcescens*.

De igual modo, en los resultados obtenidos por de FREITAS y GERMIDA (1990), entre un 80 y 90% de sus aislamientos de la rizósfera de plantas de trigo de invierno, fueron del género *Pseudomonas* y de la familia Enterobacteriaceae.

#### 4.6 Evaluación de las cepas bacterianas en plantas de trigo.

El primer estado fenológico analizado de plantas de trigo cultivar Pandora, pertenece a un estado de tres hojas, el segundo al estado de floración y el tercero al estado de grano seco. Se utilizaron como inóculo tres BSP de distinto género y con los mayores índices de solubilización, dos del género *Pseudomonas* (MN70 y MN139) y una *Klebsiella* (MN108). Se utilizó, además, una cepa fijadora de N (JS c5) del género *Klebsiella* junto a la cepa MN139.

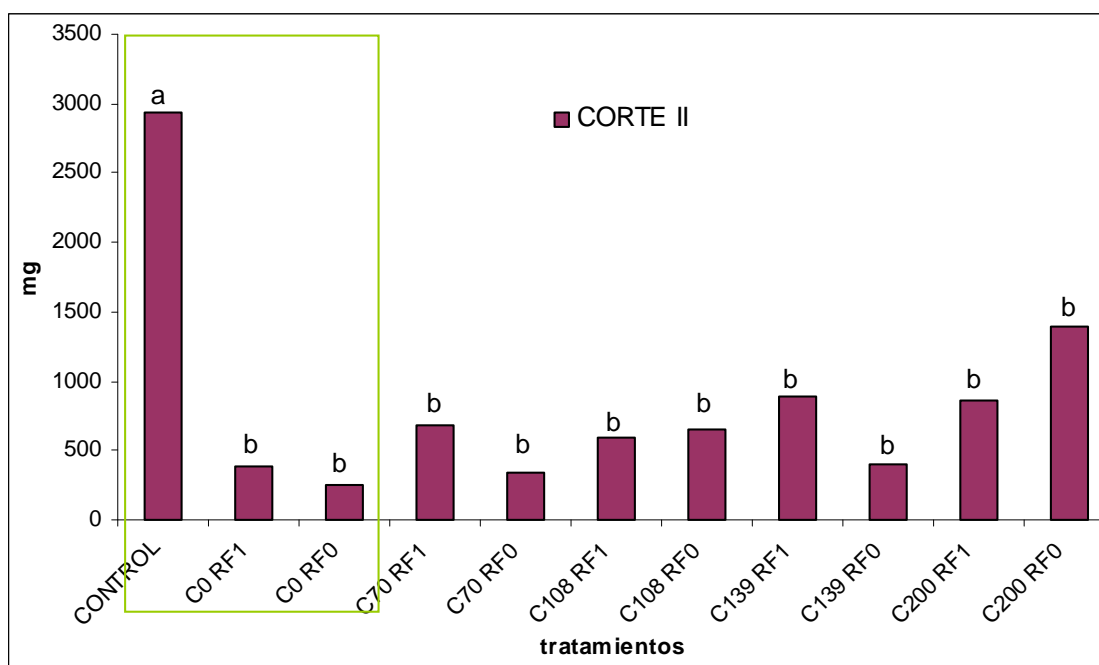
**4.6.1 Producción de materia seca total de plantas de trigo.** Esta está constituida por la suma de la materia seca aérea y la radical. En la Figura 3, se puede observar que solo el testigo sin RF y sin bacteria fue estadísticamente menor al testigo con SFT, además ningún tratamiento con inóculo bacteriano fue estadísticamente diferente a los tres testigos.



\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 3. Materia seca total (mg), por planta de trigo, en el estado de tres hojas, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

En el segundo corte (Figura 4), sólo el tratamiento testigo con SFT superó a los demás estadísticamente. Y los testigos con y sin RF fueron igual estadísticamente con los demás tratamientos con inóculos bacterianos. Por lo que no existe un efecto de la roca ni del aporte de bacteria.



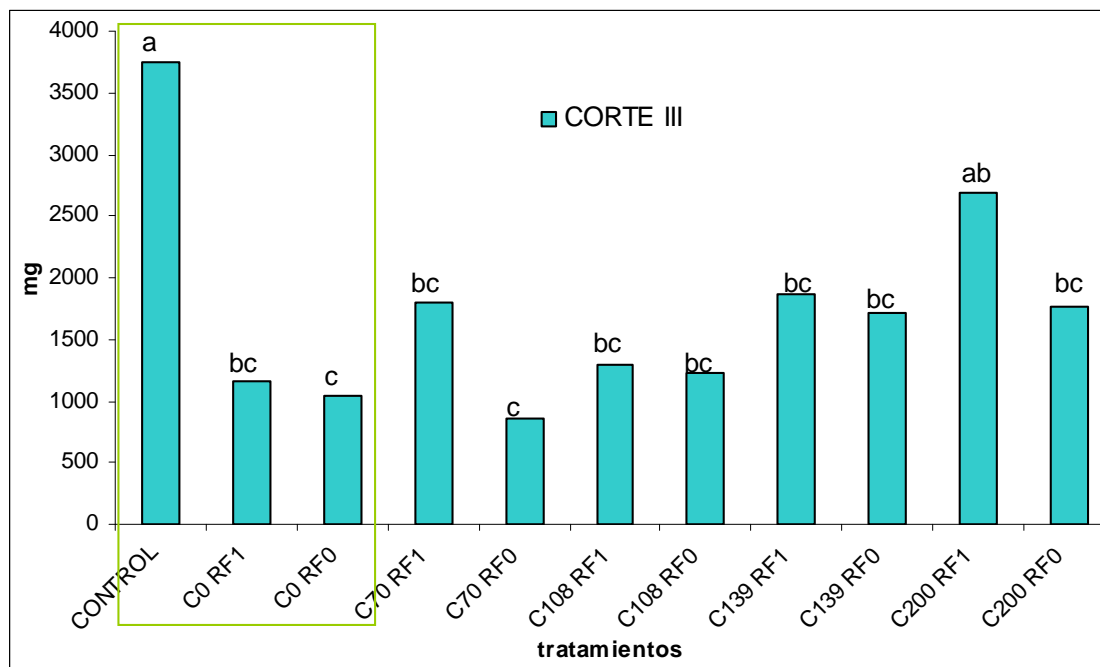
\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 4. Materia seca total (mg), por planta de trigo, en el estado de floración, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

En el último corte de trigo (Figura 5), el testigo con SFT supero a los otros dos testigo estadísticamente, sin encontrar diferencias significativas entre estos últimos. Solo el tratamiento con la co-inoculación con RF logró igualar al testigo con SFT, ya que los demás fueron estadísticamente menores.

Con respecto al tratamiento con RF y sin bacteria, todos los tratamientos inoculados fueron iguales estadísticamente. Y al igual que el testigo sin bacteria y sin roca, tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas,

comparado con los tratamientos inoculados y sin RF. Estos datos se deben a los resultados similares encontrados en materia seca aérea.



\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 5. Materia seca total (mg), por planta de trigo, en el estado de grano seco, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

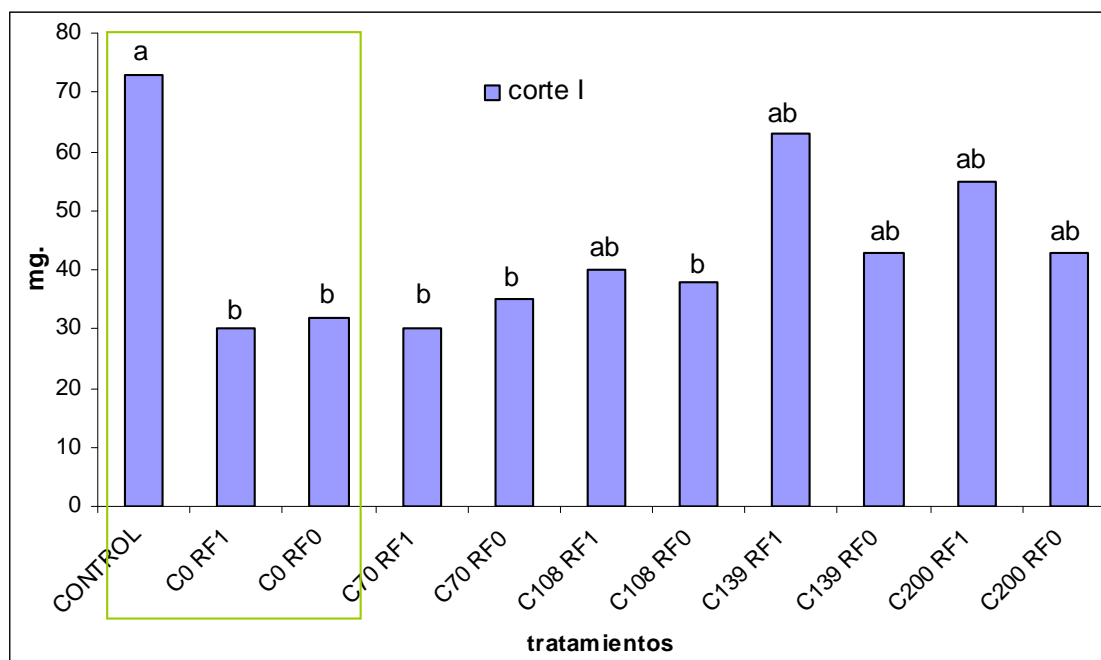
Esto nos demuestra que ésta combinación de BSP y fijadora de N es la que tuvo un efecto para la producción de materia seca total. Quizás solubilizó una mayor cantidad de P insoluble, o a través de la producción de fitohormonas la ayudo a producir mayor cantidad de pelos radicales, así obtuvo mayor cantidad de nutrientes, y aumentó su masa aérea y por lo tanto la total, como se vera en los siguientes resultados, sin embargo, no supero estadísticamente al testigo con SFT.

Este aumento de materia seca total se debe a que para generar mayor cantidad de células se necesita mayor cantidad de energía, esto es ATP compuesta de P, que es obtenida desde el suelo. Mientras más P, mayor energía tendrá la planta para producir tejidos y órganos vegetales, así como azúcares, proteínas, entre otros.

Estos resultados difieren a los analizados por CRACOGNA *et al.* (2003), ya que sus mejores resultados obtenidos de peso seco total de plantas de trigo lo fueron con la inoculación de BSP, seguido por la co-inoculación de BSP (*Pseudomonas*) y fijadora de nitrógeno (*Azospirillum*) y por último su testigo que fue sin inoculación de cepas bacterianas.

Al igual que los resultados obtenidos por SAHIN *et al.* (2004), inoculaciones realizadas con bacterias fijadoras de N, solubilizadoras de P y las mezclas de éstas en cebada demostraron que al inocular individualmente cada tipo de bacteria se obtienen resultados más bajos que al mezclar ambas. Así, la biomasa total de estas plantas fue superior al testigo sin inocular, pero nunca superaron al tratamiento con fertilizantes nitrogenados y fosforados.

4.6.1.1 Producción de materia seca aérea de plantas de trigo. De acuerdo a los resultados obtenidos en la Figura 6, encontramos diferencias significativas. El testigo con SFT supero estadísticamente a los otros dos testigos (al igual que los otros cortes), siendo estos últimos igual estadísticamente. La mayor cantidad de materia seca aérea como se debió suponer, se obtuvo con el tratamiento testigo con SFT, éste fue igualado por los tratamientos con la co-inoculación, con la cepa MN139 y la MN108 con RF, siendo los demás tratamientos estadísticamente inferiores.



\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

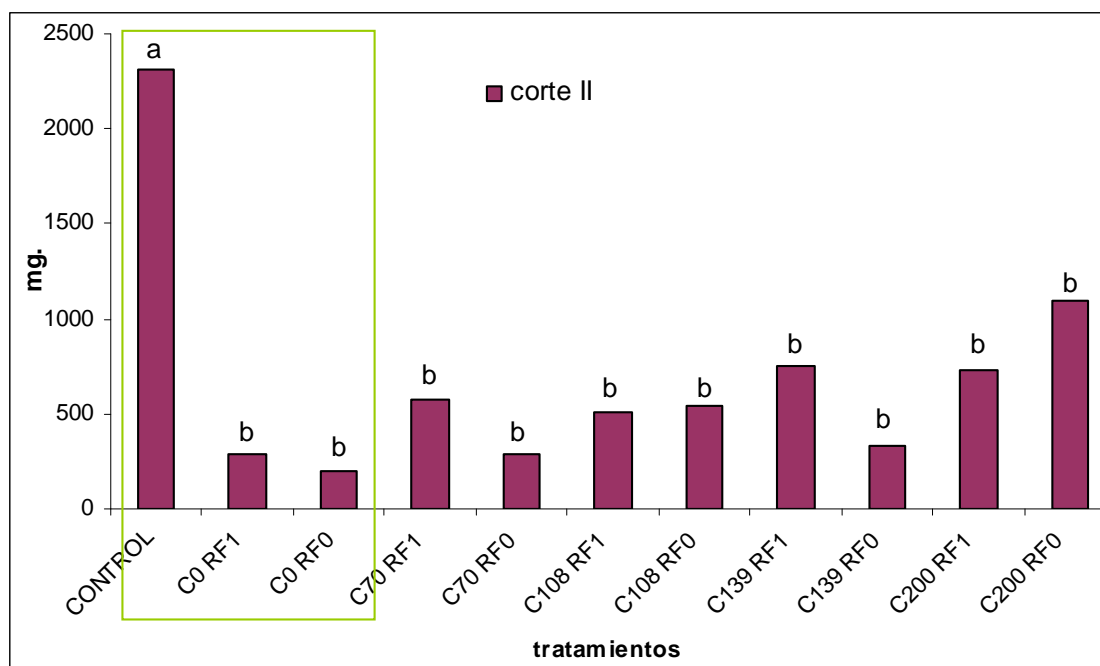
**FIGURA 6. Materia seca aérea de plantas de trigo (mg) en el primer corte, inoculado con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

Para los tratamientos testigo con y sin RF, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos inoculados con diferentes cepas bacterianas.

Para el segundo corte (Figura 7), sólo el tratamiento testigo con SFT superó a los demás significativamente. Para el testigo con y sin roca, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos con inoculaciones bacterianas.

Los mismos resultados fueron encontrados en la materia seca total, ya que este último parámetro está constituido por el analizado. Podemos decir que el estado de floración no se destaca el actuar de las cepas con respecto a los

testigos con y sin roca fosfórica. Además la incorporación de RF tampoco tuvo el efecto para los tratamientos con y sin bacterias y entre ellas. Como se debería suponer, el testigo con SFT superó al resto significativamente.



\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

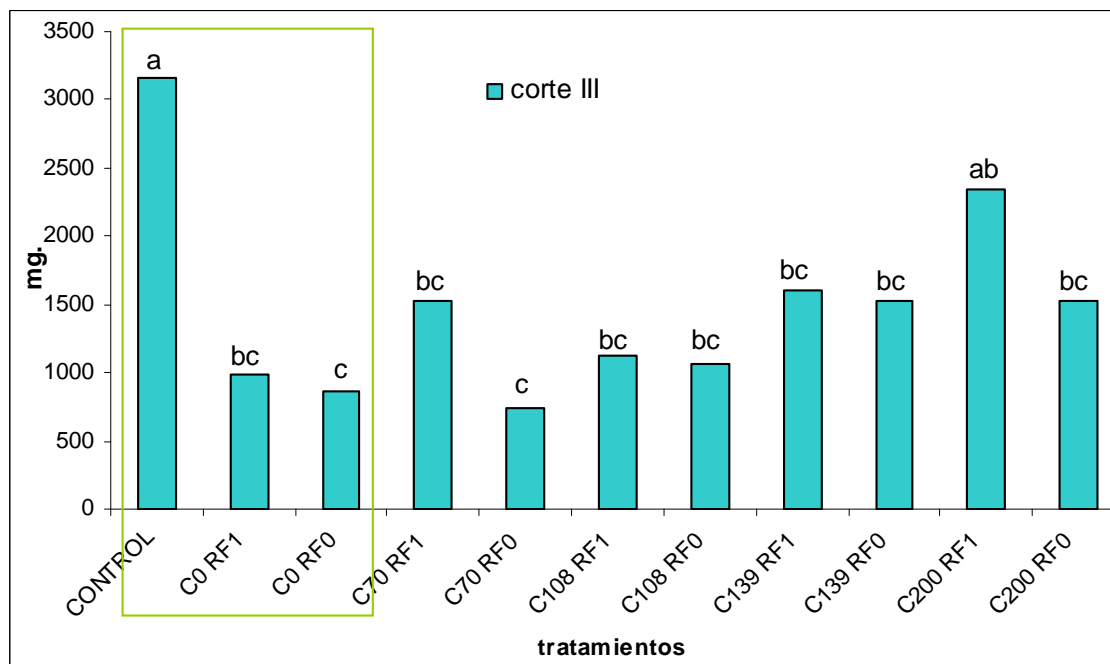
**FIGURA 7. Materia seca aérea de plantas de trigo (mg) en el estado de floración, inoculado con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

En el último corte (Figura 8), encontramos de nuevo que el testigo con SFT obtuvo el resultado más alto y fue igualado estadísticamente por la co-inoculación con RF, siendo el resto de los tratamientos estadísticamente inferiores. Se ve que la co-inoculación presenta un efecto benéfico en éste parámetro ya que estuvo más cerca de los resultados obtenidos del testigo con SFT, pero no fue capaz de superarlo.

El tratamiento testigo con RF y sin inoculación bacteriana, fue igual estadísticamente a los demás tratamientos con inoculación y RF. Y el testigo sin



RF y sin inoculación también fue igual estadísticamente a los tratamientos inoculados sin RF.



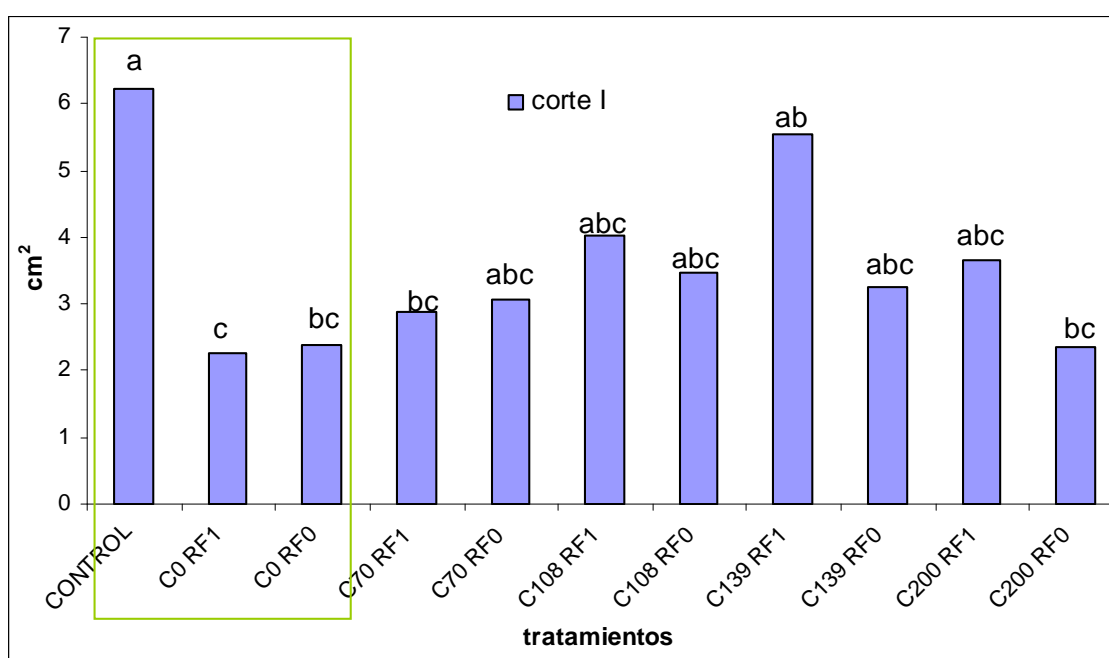
\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 8. Materia seca aérea de plantas de trigo (mg) en el estado de grano seco, inoculado con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

Podemos ver según los gráficos anteriormente analizados, que sólo en el primer y tercer corte hubo efecto de las BSF. Para el primer corte muchas bacterias estuvieron igualadas con el testigo con SFT. Y en el tercer corte sólo con la co-inoculación logro igualar al testigo con SFT. Se puede ver que sólo con el aporte de dos bacterias diferentes existiría una igualdad al testigo con SFT, con respecto a la materia seca aérea al final del ciclo del cultivo.

4.6.1.1.1 Evaluación de área foliar de plantas de trigo. En el área foliar del primer corte (Figura 9), el tratamiento que presentó los mayores resultados fue el testigo con SFT, siendo los otros dos testigos inferiores estadísticamente. El testigo con SFT fue igualado estadísticamente por la mayoría de los

tratamientos con inoculación bacteriana. Con respecto al testigo con RF, solo el tratamiento con la cepa MN139 y con RF lo superó significativamente. De esto se puede deducir que la cepa MN139 es capaz de solubilizar P insoluble de la roca y así aumentar el área foliar del trigo. Sin embargo el testigo sin RF, no fue superado estadísticamente por ninguno de los demás tratamientos inoculados. Parecidos son los resultados de la materia seca del primer corte, ya que la mayoría de las inoculaciones igualaron al testigo con SFT.

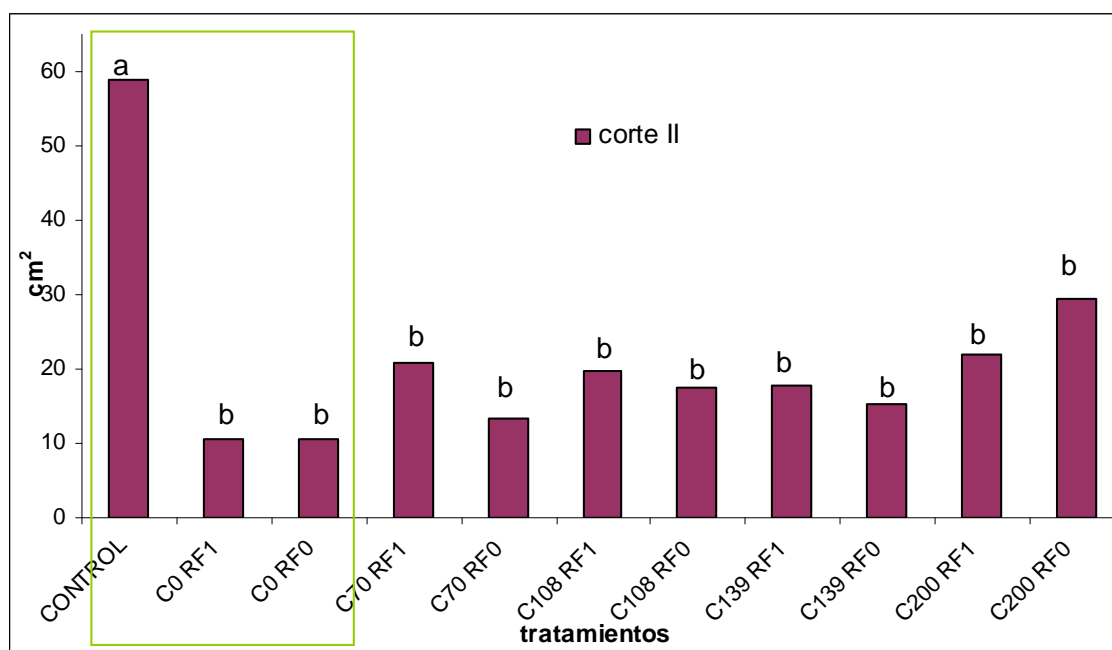


\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 9. Área foliar de plantas de trigo inoculado con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada, en el estado de tres hojas.**

Se puede ver que en la Figura 9. sólo la bacteria MN139 con RF, fue mayor estadísticamente que su testigo sin bacteria y con RF en el parámetro de área foliar, esto se debe que la cepa MN139 con RF fue capaz de solubilizar P de la roca y así la planta pudo absorber mayor cantidad de P y pudo aumentar su área foliar en el primer corte.

Como se observa en la Figura 10, el corte en estado de floración de las plantas de trigo, sólo con el testigo con SFT se obtuvieron los resultados más altos y significativos. Del resto de los tratamientos testigo con diferentes dosis de RF y con y sin cepas bacterianas no se encontraron diferencias significativas para los tratamientos con inóculo. Estos son los mismos resultados encontrados en materia seca total y aérea en el segundo corte, ya que se relacionan positivamente.



\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 10. Área foliar de plantas de trigo inoculado con distintas cepas bacterianas y diferente fertilización fosforada, en el estado de floración.**

Estos bajos resultados del área foliar con respecto al testigo con SFT, se deben a las deficiencias de P, toda vez que dicha carencia se presente, altera la dinámica de expansión y senescencia del área foliar verde, disminuye y atrasa la aparición de hojas y vástagos por planta y su supervivencia. Esto provoca

menor intercepción de radiación, produciendo así menos fotoasimilados para la producción del rendimiento final DRECCER *et al* (2004). Además, la eficiencia en el uso de la radiación disminuye al disminuir el P foliar.

4.6.1.1.2 Evaluación de la altura de plantas de trigo. En el estado de grano seco, para la altura (Cuadro 12), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

**CUADRO 12. Alto de plantas de trigo (cm) en el tercer corte, con diferentes inoculantes y fertilización fosforada.**

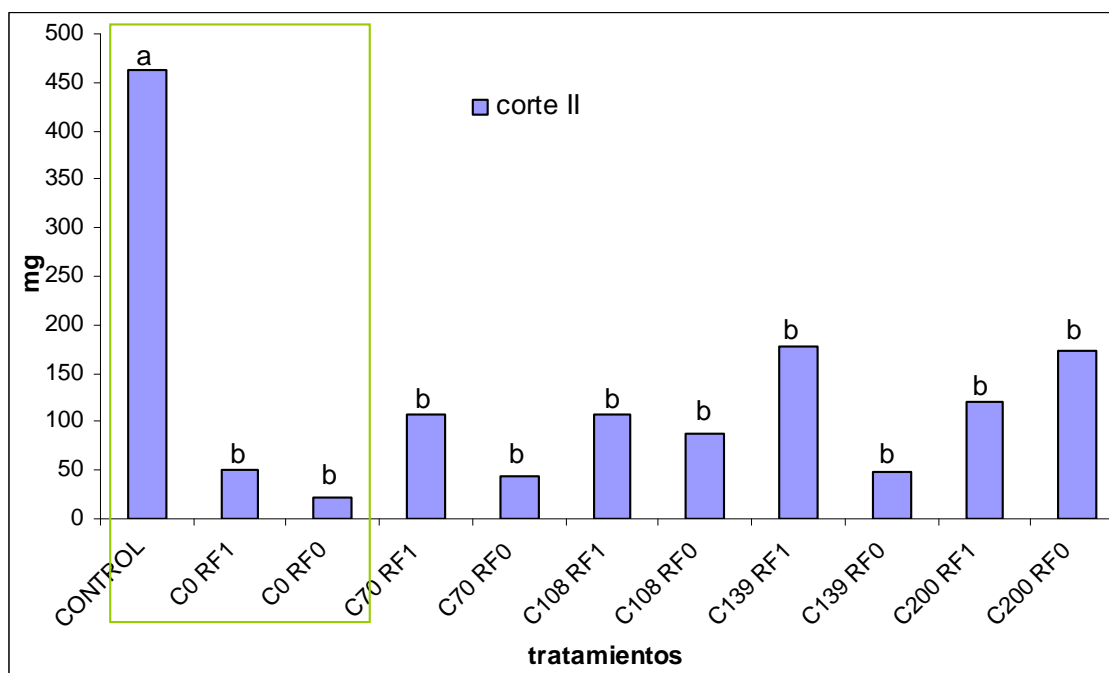
<b>Tratamientos</b>	<b>Alto (cm)</b>	
CONTROL	47,88	a
C0 RF1	42,9	a
C0 RF0	42,63	a
C70 RF1	50,08	a
C70 RF0	43,02	a
C108 RF1	44,85	a
C108 RF0	46,18	a
C139 RF1	53,08	a
C139 RF0	49,93	a
C200 RF1	55,58	a
C200 RF0	51,37	a

Al observar los tratamientos se aprecia que el alto de plantas de trigo, es uno de los parámetros en donde la inoculación con cepas bacterianas y la incorporación de distintos fertilizantes fosforados, no produjeron diferencias significativas en éste trabajo.

Sin embargo, en un ensayo de papas por FACCINI *et al* (s/f), tratamientos inoculados con BSP y bacterias fijadoras de nitrógeno superaron al testigo, siendo éste último un tratamiento con adición de fertilizante. Así también como los resultados obtenidos por de FREITAS y GERMIDA (1990), donde inoculaciones con *P. putida* aumentaron el alto de plantas en trigo de invierno, superando a otras cepas y al testigo, en este caso sin la adición de cepas. Esto incide en la producción de granos, ya que los asimilados del tallo son después translocados a los órganos reproductivos de la planta.

4.6.1.1.3 Producción de materia seca de espigas en plantas de trigo. En el segundo corte (Figura 11), solo el testigo con SFT supero significativamente a los demás tratamientos, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Al igual que los demás parámetros analizados siempre en el segundo corte se obtuvieron los mismos resultados. Lo que se puede decir que para el estado de floración, no hay efecto de las cepas bacterianas ni del aporte de roca para el peso seco de las espigas.

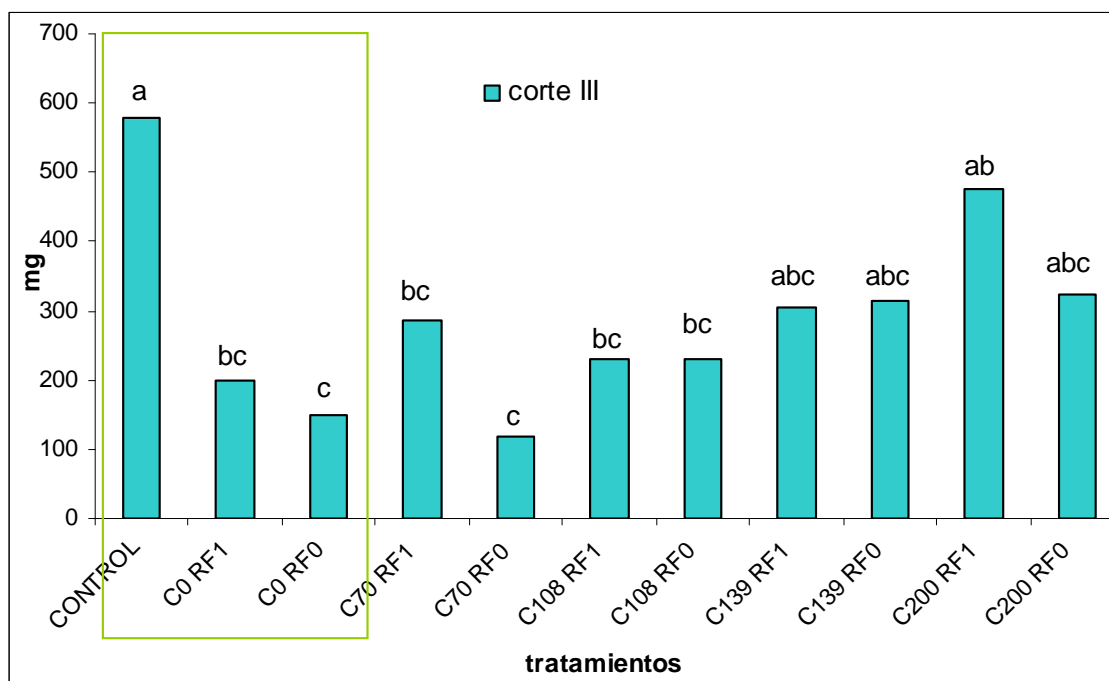


\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 11. Materia seca de espigas (mg) por planta, en el estado de floración, con diferentes cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

En el tercer corte (Figura 12), el tratamiento testigo con SFT fue el que obtuvo uno de los más altos resultados estadísticamente y los otros controles fueron inferiores estadísticamente. Los tratamientos con la co-inoculación y con la cepa MN139 lo igualaron, siendo el resto de los tratamientos menores significativamente.

Con respecto al testigo con RF, todos los tratamientos con inóculo fueron iguales estadísticamente. Al igual que el testigo sin RF, los demás tratamientos inoculados sin RF fueron iguales estadísticamente.



\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 12. Materia seca de espigas (mg) por planta, en el estado de grano seco, con diferentes cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

4.6.1.2 Producción de materia seca radical de plantas de trigo. Como se puede observar en el Cuadro 13, en el primer corte de trigo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

En el segundo corte (Cuadro 13), sólo el tratamiento testigo superó a los demás tratamientos significativamente, y no se encontraron diferencias significativas entre estos últimos. Por lo que se puede inferir que no hay efecto de las bacterias en la materia seca de raíz en el segundo corte. Estos resultados son iguales a los obtenidos en materia seca aérea, total, de espigas y en el área foliar. Por lo que se puede deducir que en el segundo corte, no hay efecto de las bacterias en ningún parámetro analizado de materia seca ni área foliar.

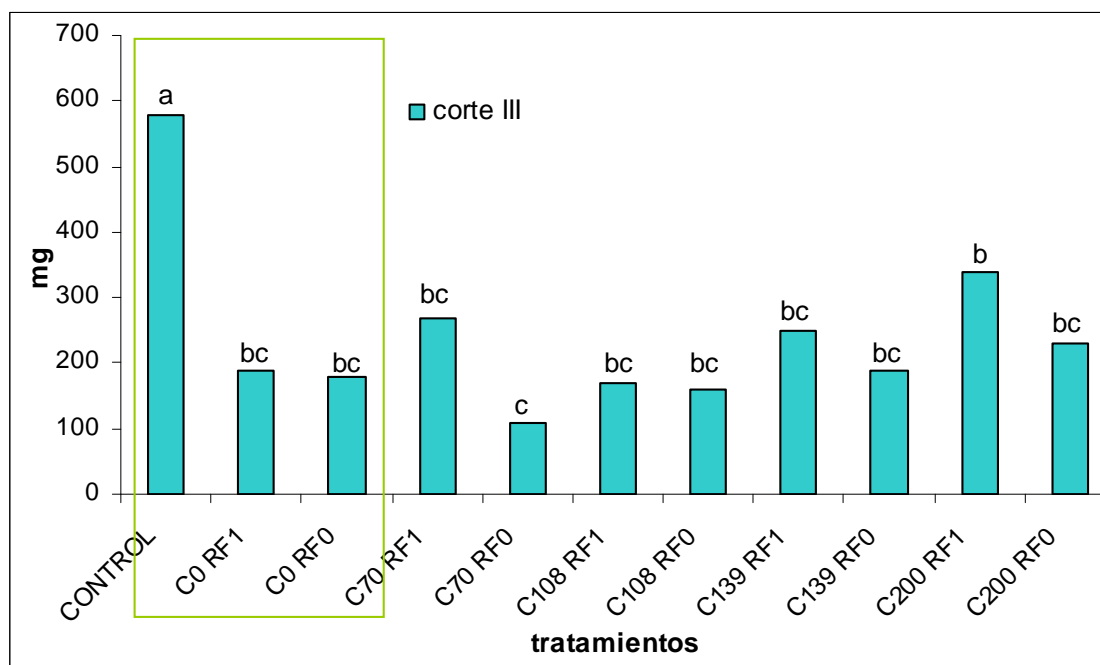
**CUADRO 13. Materia seca de raíz (mg), en el primer y segundo corte, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

Tratamientos	Materia seca de raíz (mg)			
	CORTE I		CORTE II	
CONTROL	45	a	620	a
C0 RF1	33	a	100	b
C0 RF0	25	a	50	b
C70 RF1	28	a	110	b
C70 RF0	33	a	60	b
C108 RF1	33	a	90	b
C108 RF0	30	a	120	b
C139 RF1	45	a	140	b
C139 RF0	35	a	70	b
C200 RF1	45	a	130	b
C200 RF0	27	a	150	b

En el tercer corte (Figura 13), el mejor tratamiento como se debería haber supuesto es el testigo con SFT con diferencias significativas, siendo los demás tratamientos menores estadísticamente.

El testigo con y sin RF se encontraron igualdades estadísticas frente a los demás tratamientos con inóculos y no existen diferencias significativas entre ellos.





\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 13. Materia seca de raíz (mg), en el estado de grano seco con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

Resultados totalmente diferentes fueron obtenidos por FACCINI *et al* (s/f) para la masa radical en un ensayo con papas, donde el tratamiento co-inoculado con BSP y fijadoras de N, superaron a los tratamientos sin inocular e incluso al testigo con fertilizantes inorgánicos de N, P y potasio.

Otros resultados distintos a los obtenidos a este trabajo fueron los encontrados por de FREITAS y GERMIDA (1990), donde encontraron que la inoculación con *Pseudomonas* en trigo de invierno en dos tipos de suelo, aumentaron el peso seco de raíces con respecto a los sin inocular.

En los tratamientos analizados anteriormente, no hay diferencias estadísticas, salvo en el área foliar por la bacteria MN139 con RF, que supero en el estado de tres hojas a su testigo no inoculado pero no fue superior al testigo con SFT. Lo que demuestra que ésta bacteria solubiliza el P insoluble.

Los demás parámetros analizados, no se marcaron estas diferencias. Además en varios análisis de materia seca el tratamiento co-inoculado con RF igualo al testigo con SFT.

Es posible apreciar que la materia seca de raíces, esta correlacionada con la materia seca aérea, mientras mayor sea la materia seca de raíces, mayor es la materia seca aérea. Se puede concluir que mientras mayor cantidad de masa radical, mayor exploración del suelo para interceptar elementos nutritivos. Así hay un aumento del crecimiento de la parte aérea, mayor fotosíntesis, producción de fotoasimilados y por lo tanto aumento de la producción.

4.6.1.2.1 Evaluación de la superficie radical de plantas de trigo. En el primer corte (Cuadro 14), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. En el segundo corte, ésta diferencia se encontró sólo en el testigo con respecto a los demás (Cuadro 14). Por lo tanto en ninguno de los dos cortes existió efecto de las bacterias.

Se puede inferir que el testigo al tener todos los nutrientes solubles, inclusive el P, como superfosfato triple, los absorbe más rápido y en mayor cantidad que los demás tratamientos. Bajos resultados se obtuvieron al fertilizar con RF ya que es poco soluble, al igual que donde no hubo fertilización fosforada. Así el testigo aumenta su superficie radical, más rápido que los demás tratamientos y tiene mayor masa radicular en el estado de floración.

**CUADRO 14. Superficie de raíces (cm<sup>2</sup>), en dos cortes de trigo, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada**

Tratamientos	Superficie de raíces (cm <sup>2</sup> )			
	CORTE I		CORTE II	
CONTROL	23,42	a	317,1	a
C0 RF1	10,8	a	53,14	b
C0 RF0	11,25	a	13,71	b
C70 RF1	5,89	a	49,18	b
C70 RF0	6,44	a	17,07	b
C108 RF1	4,97	a	25,74	b
C108 RF0	5,62	a	31,6	b
C139 RF1	13,23	a	50,63	b
C139 RF0	11,61	a	14,67	b
C200 RF1	15,73	a	52,25	b
C200 RF0	7,62	a	63,94	b

4.6.1.2.2 Evaluación del largo total de raíces de plantas de trigo. Al igual que en la superficie de raíces, el largo total de raíces (Cuadro 15) sigue la misma tendencia, ya que en el primer corte, las diferencias no son significativas.

En el segundo corte (Cuadro 15), las diferencias fueron significativas en el tratamiento testigo, ya que superó a todos los demás, y entre estos últimos no hubo diferencias significativas.

**CUADRO 15. Largo total de raíces de trigo (cm), en dos cortes, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

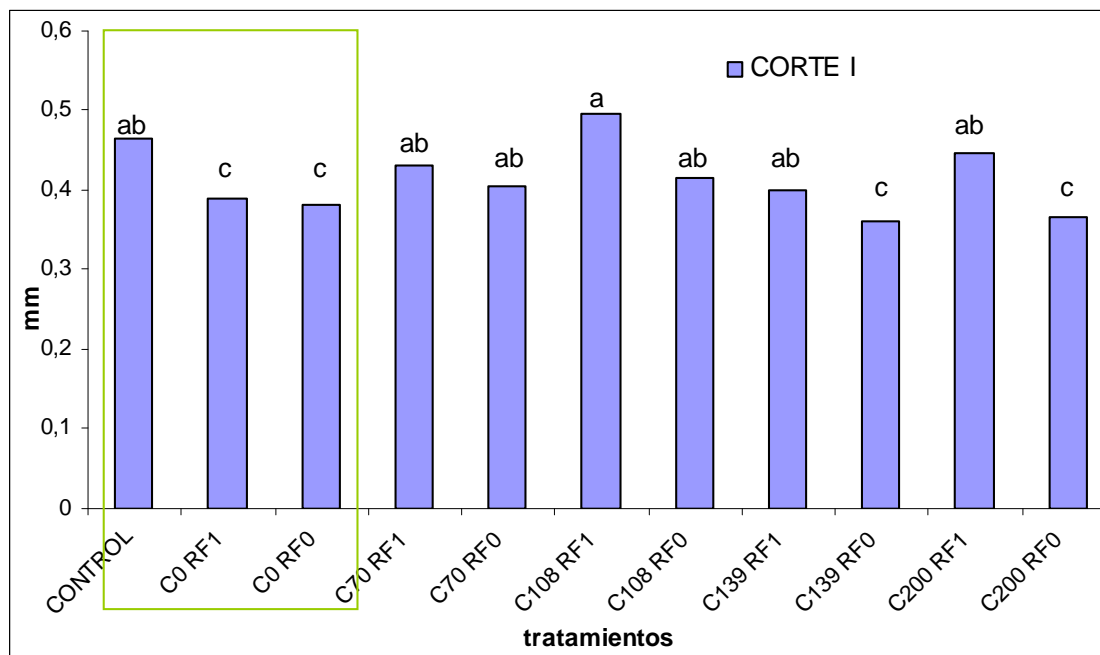
Tratamientos	Largo de raíces (cm)			
	CORTE I		CORTE II	
CONTROL	155,37	a	2280,53	a
C0 RF1	88,61	a	359,08	b
C0 RF0	93,15	a	116,45	b
C70 RF1	43,92	a	416,15	b
C70 RF0	53,3	a	164	b
C108 RF1	32,13	a	236,24	b
C108 RF0	44,67	a	278,39	b
C139 RF1	105,03	a	342,49	b
C139 RF0	101,85	a	112,38	b
C200 RF1	115,07	a	354,67	b
C200 RF0	66,08	a	420,72	b

La superficie y el largo de raíces son complementarios, ya que si existe una mayor longitud radical, su superficie será mayor, por tanto lo explicado en la parámetro anterior, vale para el largo total de raíces.

Estas mismas diferencias se encontraron en todos los parámetros anteriormente analizados en el segundo corte sin embargo los datos analizados para el primer corte fueron diferentes.

4.6.1.2.3 Evaluación del diámetro radical en plantas de trigo. En el primer corte (Figura14), el testigo con SFT fue mayor estadísticamente a los otros testigos. Casi todos los tratamientos inoculados, fueron iguales al testigo con SFT. Con respecto al tratamiento sin inocular, con RF todos los tratamientos inoculados

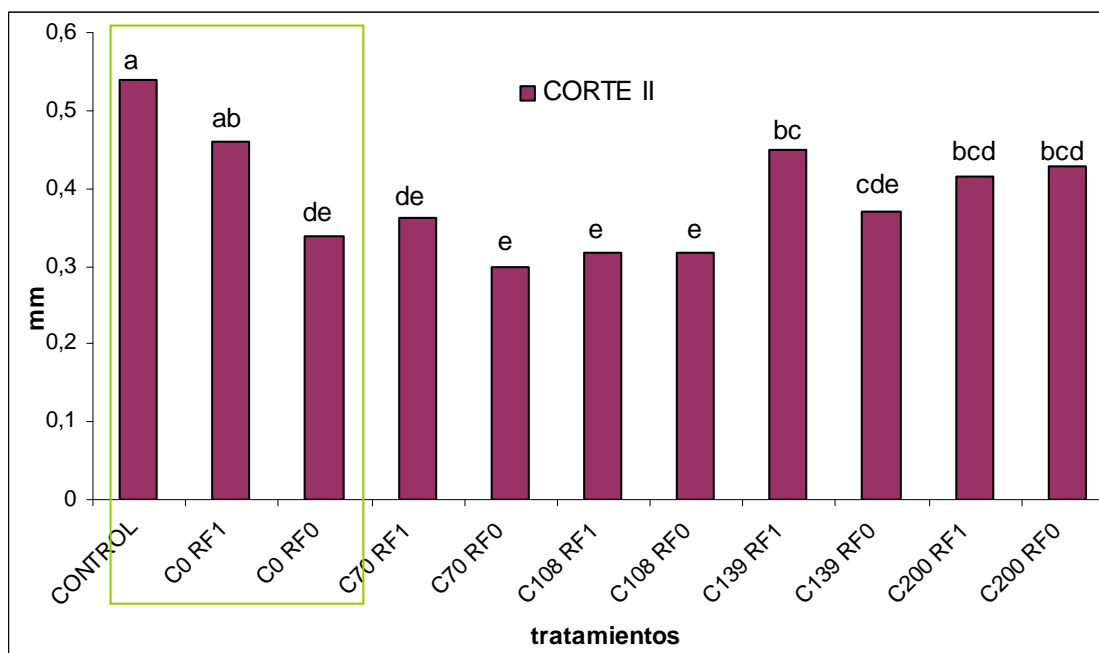
con RF superaron estadísticamente a éste testigo. Sin embargo, el testigo sin RF fue superado solo por la cepa MN70 y MN108 para ambos sin RF.



\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 14. Diámetro de raíces (mm), en el estado de tres hojas, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

Podemos darnos cuenta que donde hubo inoculaciones bacterianas, la mayoría igualo al testigo con SFT, ésto se debe que al tener P disponible (Solubilización de P insoluble), las raíces no se alargan tanto para encontrar el fertilizante soluble, y por lo tanto su diámetro no disminuye. Al contrario al no estar disponible el fertilizante soluble, las raíces deben alargarse disminuyendo su diámetro, pero aumentando su largo, no encontrándose diferencias entre la superficie de raíces.



\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

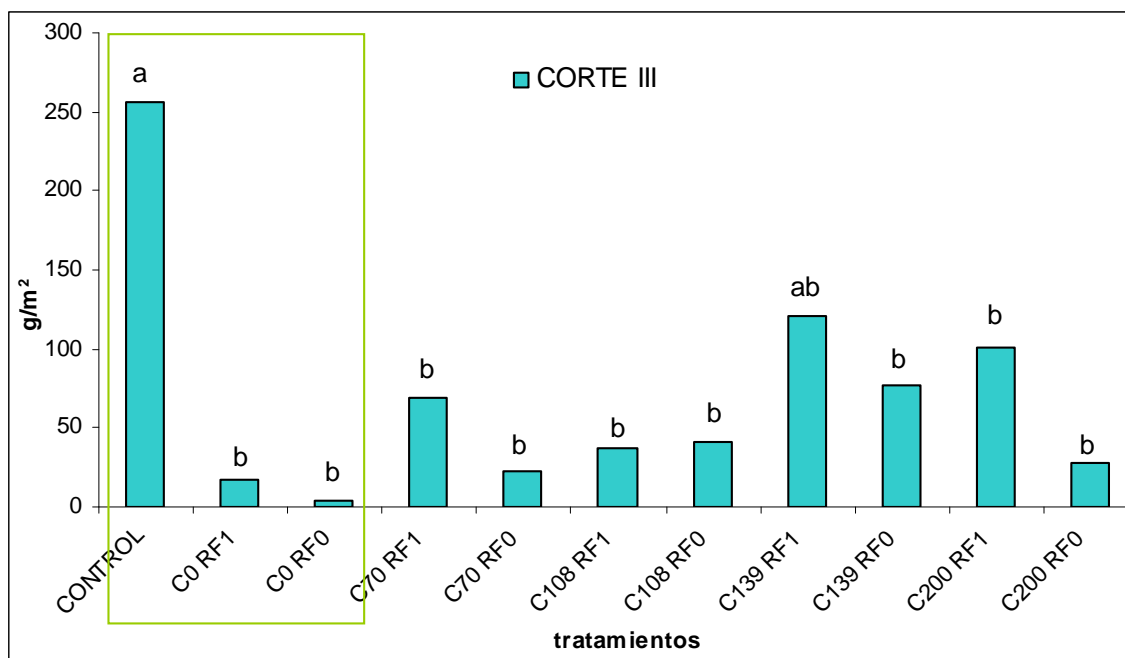
**FIGURA 15. Diámetro de raíces (mm), en estado de floración, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

En el segundo corte (Figura 15) también las diferencias fueron significativas, el testigo con SFT fue igualado por el testigo con RF pero el tratamiento testigo sin RF fue inferior. Ningún tratamiento con inóculo supero ni igualo al testigo con SFT sino que fueron menores estadísticamente al igual que el resto de parámetros analizados anteriormente. Para el tratamiento testigo con RF, solo lo igualo los tratamientos con la co-inoculación y con la cepa MN139, para ambas con RF, siendo el resto estadísticamente inferior. Por último para el tratamiento testigo sin RF, todos los tratamientos inoculados sin RF fueron igual estadísticamente.

Con estos datos anteriormente analizados se puede deducir que en el primer corte no se encontraron diferencias en el largo y superficie de raíces, sin embargo, en el diámetro casi todas las inoculaciones fueron igualadas al testigo con SFT.

El tratamiento testigo con SFT, siempre fue el mayor en el largo y superficie de raíces en el segundo corte, sin encontrar diferencias significativas entre los demás tratamientos. En el diámetro tuvo el mejor resultado, pero se encontraron diferencias entre los demás tratamientos, ya que fueron mas bajos que el testigo con SFT.

**4.6.2 Rendimiento del trigo.** El mayor rendimiento se obtuvo con el tratamiento testigo con SFT, los otros dos testigos fueron inferiores estadísticamente e iguales entre ellos. Sólo igualo al testigo con SFT el tratamiento con la cepa MN139 con RF, ya que los demás tratamientos fueron inferiores, pero sin diferencias significativas entre ellos. Con respecto a los testigos con y sin RF, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos inoculados.



\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 16. Rendimiento del trigo ( $\text{g/m}^2$ ), con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

Las cepas bacterianas inoculadas no fueron capaces de superar significativamente a los tratamientos testigos con y sin roca.

Esto se debe que al tener bajo niveles de P para su absorción, afecta la producción y rendimiento del cultivo DRECCER *et al* (2004), al afectar el tamaño y actividad de las fuentes de fotoasimilados y tamaño y cantidad de destino de los fotoasimilados.

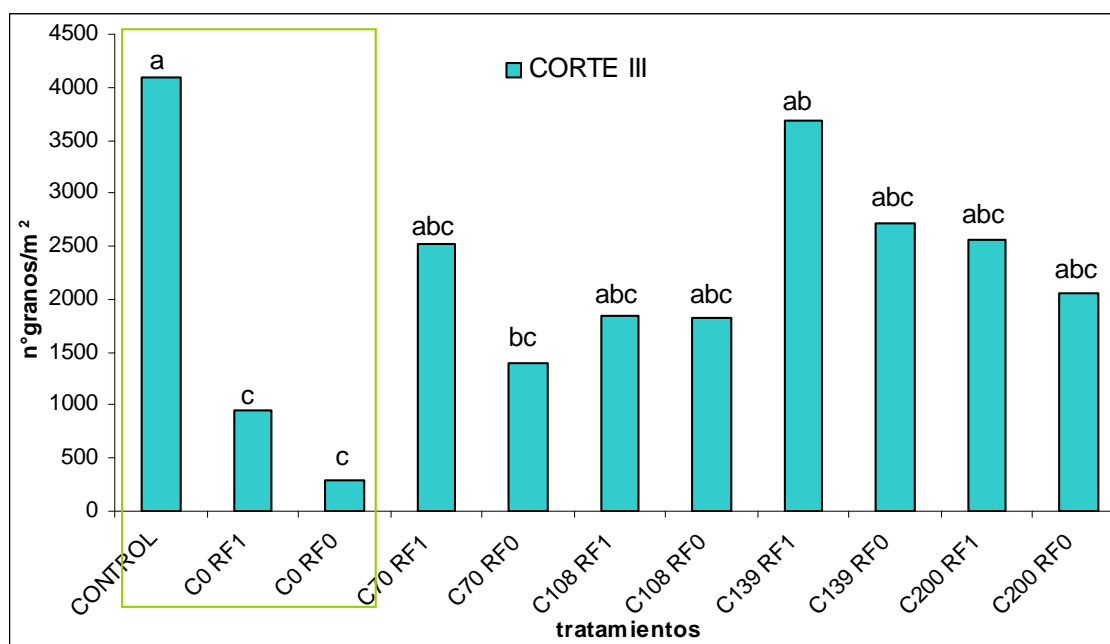
Si comparamos estos resultados con la Figura 5, la biomasa total producida está estrechamente relacionada con el rendimiento SLAFER *et al* (2004). Sin embargo, hay un acaso particular con la cepa MN139 con RF ya que al no igualar al testigo con SFT en la materia seca total, si lo hizo en el rendimiento del trigo, lo que se debería a una mayor eficiencia en el uso de sus asimilados. Y como veremos en la Figura 17, éste mayor resultado se debe al mayor número de granos por metro cuadrado producido, lo que está estrechamente relacionado con el rendimiento.

Por tanto, la inoculación con la cepa MN139 con RF, produce efectos benéficos en la producción del trigo ya que igualo al testigo con SFT. Por esto se puede concluir que esta bacteria, tiene mayor capacidad de solubilizar el P insoluble de la roca que las demás cepas.

Diferentes resultados fueron obtenidos por SAHIN *et al* (2004), que encontró en cebada que inoculaciones con mezcla de BSP y fijadoras de N, dieron mayores rendimiento en la producción de granos que la simple inoculación con BSP. Además al igual que los resultados obtenidos en este ensayo, los tratamientos inoculados nunca superaron al testigo con fertilizantes nitrogenados, potásicos y fosforados.



4.6.2.1 Producción de granos por metro cuadrado en plantas de trigo. Para el número de granos, en el tercer corte (Figura 17) existen diferencias significativas, el mayor resultado lo obtuvo el testigo con SFT, siendo los otros dos testigos menores estadísticamente e iguales entre éstos últimos. El tratamiento testigo con SFT fueron igualados por los tratamientos inoculados con y sin adición de RF, excepto con la cepa MN70 sin roca. Por otro lado para el testigo con y sin RF solo fue superado estadísticamente por el tratamiento con la cepa MN139 con RF.



\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 17. Número de granos de trigo por metro cuadrado con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

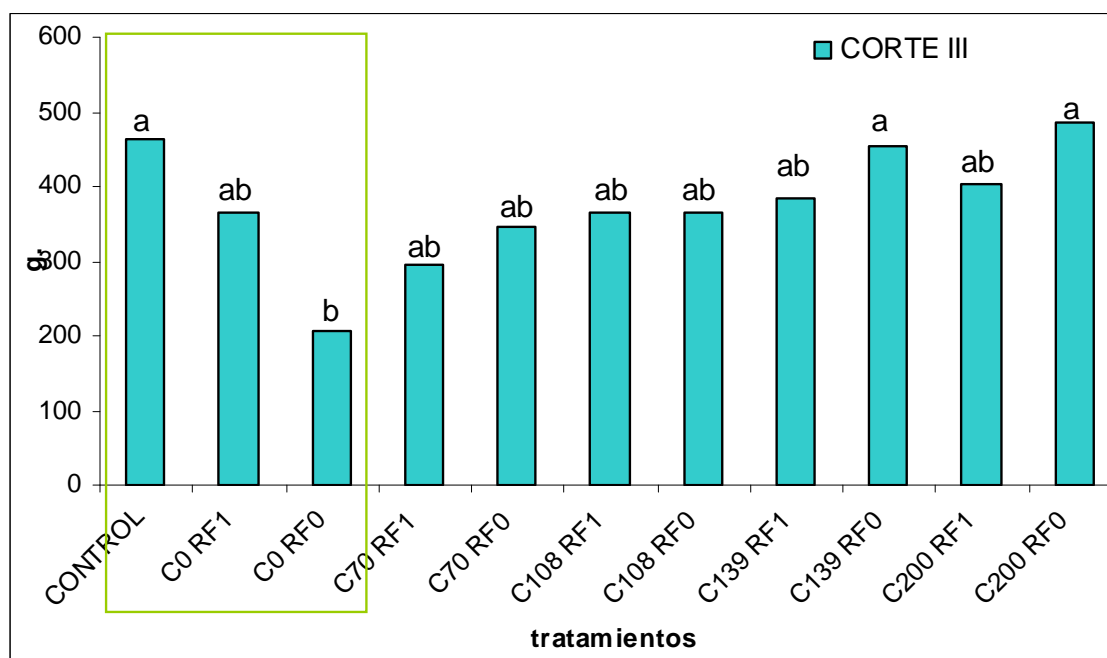
Se puede confirmar que la cepa MN139 con RF, es capaz de solubilizar mayor cantidad de P insoluble para que la planta lo pueda utilizar para aumentar su producción, en este caso, en el número de granos, que es el parámetro que más determina la producción de este cereal.

Al igual que los resultados obtenidos en trigo por CRACOGNA *et al* (2003) y los mayores números de grano fueron obtenidos por la inoculación con BSP. Además demostraron que resultados con BSP y fijadoras de N, no superaron a la que sólo se inoculó con BSP, pero si lo hicieron con el tratamiento sin la inoculación de cepas bacterianas.

Similares son los resultados obtenidos por SHARMA y PRASAD (2003) y SHARMA *et al*, (1983), en ensayos realizados con BSP inoculadas en trigo, arroz y lentejas, además con RF Mussoorie, donde obtuvieron incrementos en la producción y de granos con respecto a las no inoculados. Incluso la eficiencia en la utilización del P fue aumentando cuando se le incorporaron los residuos del trigo y arroz en ensayos posteriores a éstos. Esto, ya que las BSP llegaron a una igualdad con el testigo fertilizado con fosfato diamónico.

Resultados obtenidos por RIZOBACTER (2004), en los rendimientos de trigo, siempre fueron mayores con la adición de BSP para tratamientos con distintas dosis de P y N.

4.6.2.1.1 Producción de espigas por metro cuadrado en plantas de trigo. En el tercer corte Figura 18, el testigo con SFT mayor estadísticamente por el tratamiento control sin RF, además fue igualado estadísticamente por los tratamientos inoculados con y sin RF. Con respecto al testigo con RF, ningún tratamiento inoculado fue diferente estadísticamente. Sin embargo, el testigo sin RF fue superado estadísticamente por la cepa MN139 y la co-inoculación, para ambas sin RF. Pero estos dos últimos tratamientos no fueron los mejores, ya que como se analizo en el grafico anterior en peso de espigas, estos fueron con bajos pesos y como se vera a continuación los granos fueron pocos y con bajo peso

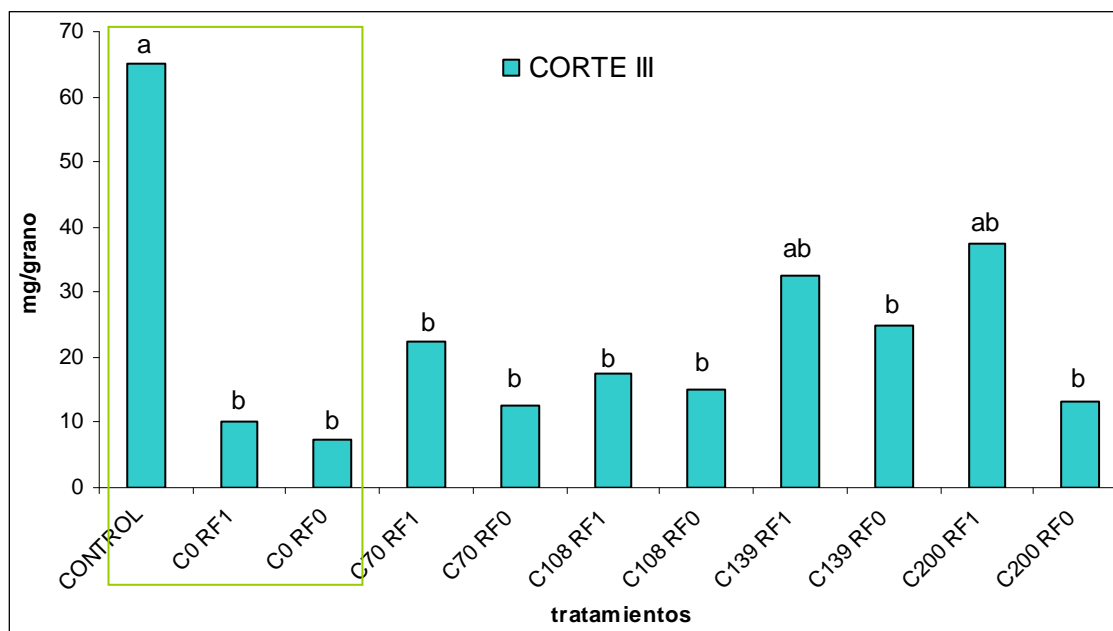


\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 18. Número de espigas/m<sup>2</sup> en el estado de grano seco de trigo, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

4.6.2.2 Producción de materia seca de granos en plantas de trigo. Según los datos graficados en la Figura 19, los mayores pesos de los granos de trigo, se obtuvieron con el tratamiento testigo con SFT, los otros dos testigos fueron inferiores estadísticamente. El testigo con SFT fue igualado por los tratamientos con la cepa MN139 y con la co-inoculación, para ambos con RF. Para los testigos con RF, no hubo diferencias significativas para los tratamientos con inoculaciones. Con respecto al tratamiento testigo sin RF, fueron iguales estadísticamente a los tratamiento inoculados sin RF.

Según lo obtenido por CRACOGNA *et al* (2003), los mejores resultados fueron obtenidos por la co-inoculación de BSP y fijadoras de N que sólo con la inoculación de BSP. Lo que es diferente a los resultados visto en éste grafico, ya que los con la inoculación de BSP y con la co-inoculación no se encontraron diferencias significativas en el peso seco de grano.



\*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Tuckey). Cuadro verde muestra tres tratamientos testigos.

**FIGURA 19. Peso seco de granos de trigo (mg) con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

4.6.2.3 Peso seco de 1000 granos. En el peso seco de los 1000 granos, no se encontraron diferencias significativas.

Con estos resultados nos podemos dar cuenta que con la adición de SFT, de RF, sin adición de fertilizante o alguna cepa bacteriana, no existieron diferencias significativas en el peso de los 1000 granos. Lo que quiere decir que el P no tiene efecto en este parámetro analizado.

**CUADRO 16. Peso seco de los 1000 granos (g), en trigo, con distintas cepas bacterianas y fertilización fosforada.**

Tratamientos	Materia seca 1000 granos (g)	
CONTROL	18,95	a
C0 RF1	21,25	a
C0 RF0	15,45	a
C70 RF1	21,58	a
C70 RF0	13,48	a
C108 RF1	22,08	a
C108 RF0	16,68	a
C139 RF1	20,95	a
C139 RF0	19,58	a
C200 RF1	20,78	a
C200 RF0	19,6	a

Según DRECCER *et al* (2004), la oferta de nutrientes influye sobre el número de granos por m<sup>2</sup>, número de órganos cosechables por unidad de superficie y número de granos por estructura reproductiva en el cultivo de trigo. De la misma manera un aumento en la disponibilidad de nitrógeno y P, favorece el macollaje y la fertilidad de los macollos, y así incide en la determinación del número de espigas por m<sup>2</sup>. Lo que se puede observar en los gráficos anteriormente analizados, en donde los tratamientos inoculados con la cepa MN139 y con la co-inoculación, se obtuvieron los mayores resultados igualados al testigo con SFT. Por lo que se puede deducir que existiría mayor disponibilidad de P que los demás tratamientos, ya sea con otras cepas o simplemente tratamientos sin inoculación, pero nunca superaron al testigo.

Para el parámetro de materia seca total y aérea el único tratamiento que igualo al testigo con SFT fue la co-inoculación con RF. Para materia seca de espigas, lo igualo la co-inoculación y la cepa MN139. En el caso del rendimiento

la única que igualo al testigo con SFT fue el tratamiento con la cepa MN139 y con RF. Para el número de granos por metro cuadrado, casi todos los tratamientos inoculados lo igualaron. Y solo supero estadísticamente la cepa MN139 con RF a su testigo sin inoculación y con RF en el parámetro de la determinación del rendimiento que es el de número de granos por metro cuadrado.

Bacterias como la MN139 y la co-inoculación, obtuvieron mayor número de parámetros igualados al testigo por lo que se puede concluir, que hubo una mayor disponibilidad o solubilización del fertilizante fosforado, en este caso RF Carolina del Norte, ya que el fertilizante nitrogenado fue disponible e igual para todos los tratamientos. Sin embargo no fueron los mismos resultados obtenidos en laboratorio (*in vivo*) ya que mayores I.S. fue de la cepa MN108, la que no tuvo mayor efecto en el trigo, pero la cepa MN139, la que obtuvo menor I.S. de las cepas seleccionadas, fue la que obtuvo los mejores resultados *in vivo*.

Como se podría haber esperado de la co-inoculación de cepas bacterianas, al obtener similares resultados que el testigo con SFT en varios parámetros de materia seca, se obtuvieran también los mismos resultados en la producción de granos, pero esto solo tuvo lugar con la inoculación de la bacteria MN139 y con RF. Esto se puede deber a que habría una mayor cantidad de P en las plantas inoculadas con BSP, ya que al adicionar la bacteria fijadora de N, éstas podrían haber ocupado parte del P solubilizado para su propio crecimiento, y así dejar menos disponible P soluble para ser absorbido por el trigo.

#### **4.7 P disponible en el suelo antes y después del ensayo**

Antes de realizar el ensayo del trigo en macetas, se analizó el suelo seleccionado y al final del ensayo, se procedió a medir sólo el P-Olsen para todos los tratamientos realizados, como lo muestra el Cuadro 17.

**CUADRO 17. Ppm de P-Olsen analizado del suelo seleccionado de un bosque de Valdivia, antes y después del ensayo de macetas de trigo.**

TRATAMIENTOS	P. INICIAL (ppm P-	
	Olsen)	P. FINAL(ppm P-Olsen)
Testigo	2,3	9,1
C0-RF1	2,3	4,3
C0-RF0	2,3	2,0
C70-RF1	2,3	3,3
C70-RF0	2,3	2,0
C108-RF1	2,3	3,2
C108-RF0	2,3	2,0
C139-RF1	2,3	3,0
C139-RF0	2,3	2,0
C200- RF1	2,3	2,8
C200- RF0	2,3	2,0

Como se puede observar en el Cuadro 17, los tratamientos en donde no se le agregó al suelo RF como el testigo y con inoculaciones bacterianas, bajaron 0,3 ppm su P-Olsen del suelo, quedando todos con la misma cantidad de P final, 2 ppm P-Olsen. Estos resultados nos confirman que como no se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos, el P final debería ser el mismo.

Hay también un notorio aumento del P-Olsen en el tratamiento testigo, lo que aumentó 6,7 ppm. Esto se debe al P soluble que se administró al suelo al principio del ensayo.

Por otro lado, están los tratamientos con suministro de RF Carolina del Norte donde nos podemos dar cuenta que los que tienen los menores ppm de

P-Olsen al final del ensayo, son los tratamientos con los que obtuvimos resultados igualados con el testigo con SFT, en los parámetros anteriormente analizados en trigo.

Uno de estos casos en donde la co-inoculación se igualo en muchos parámetros de materia seca con el testigo con SFT y donde los resultados finales de P del suelo son los menores del total de los tratamientos en donde se le adicionó RF.

El otro caso a destacar es el inoculado con la cepa MN139 y con RF, la cual fue igualada con el testigo con SFT, en el rendimiento y número de granos por metro cuadrado y su P final es el segundo mas bajo de todos los tratamientos adicionados con RF.

Podemos deducir que estos menores resultados son producto de la mejor utilización del P gracias la co-inoculación y la adición de la cepa MN139, donde existió una igualdad con respecto al testigo con SFT en varios parámetros analizados, de materia seca y rendimiento respectivamente. Deriva de ésto, una mayor eficiencia en ocupar este elemento desde el suelo, por acción de estas dos inoculaciones, lo que puede deberse a la solubilización de este P poco soluble agregado como RF.

Algunas cepas solubilizan mayor cantidad y de forma más rápida la RF que otras, este P solubilizado, queda disponible para la planta en forma mas directa que el P soluble del suelo, ya que el P que solubiliza la bacteria queda en la misma rizósfera, donde se encuentran estas bacterias, en cambio para alcanzar el P soluble la planta tiene que elongar sus raíces (gastar energía) asta alcanzarla.



Los tratamientos con RF que presentan los mayores resultados al final, corresponde a una lenta solubilización de la RF, y pobre o nula acción de la BSP, dejando P soluble al término del ciclo del cultivo, donde la planta ya no tenía la necesidad de absorber ésta.

## 5 CONCLUSIONES.

- Se acepta la hipótesis donde se plantea que en la rizósfera de especies arbustivas de *Rubus* spp. y *Berberis microphylla* con crecimiento exagerado en un suelo Trumao del sur de Chile, existen bacterias con la capacidad de solubilizar fósforo *in vitro*. Pero se acepta parcialmente que inoculaciones en trigo incrementarían la producción.
- De las diez cepas seleccionadas con la mayor capacidad de solubilizar P, la mayoría pertenece al género *Pseudomonas*, obtenidas del arbusto Murra alemana (*Rubus ulmifolius*).
- Los mayores Indices de Solubilización de P fueron obtenidos por las bacterias del género *Klebsiella* y *Pseudomonas*.
- Con pH entre 3,9 a 4,1, se obtuvieron los mayores Indices de Solubilización, por lo tanto éste efecto depende del tipo de ácido y no del poder acidificante de los ácidos que produzcan las cepas bacterianas.
- En la evaluación de cepas bacterianas en trigo, ningún tratamiento inoculado por bacterias logró superar al tratamiento testigo con SFT, en todos los parámetros analizados.
- En los parámetros de materia seca, el tratamiento con la co-inoculación igualo al testigo con SFT, sin embargo, en el rendimiento el tratamiento que lo igualo fue la cepa MN139 con RF. Pero ninguno de estos tratamientos con inoculaciones bacterianas logro superar a éste testigo potencial.

- Ningún tratamiento con inoculaciones bacterianas logro superar a su testigo sin inoculación, lo que demuestra que estas bacterias, no solubilizan lo suficiente P ya sea de la roca o de un suelo pobre en P para aumentar estadísticamente la producción del trigo. Sin embargo la cepa MN139, supero a su testigo en el número de granos por metro cuadrado, e igualo al testigo con SFT, lo que muestra una mayor eficiencia por parte de esta cepa para la producción en trigo.
- Los tratamientos al final del ensayo con menor P-Olsen, son los tratamientos que fueron igualados con el testigo con SFT, caso de la co-inoculación y con la cepa MN139, para ambos con RF.
- Se puede concluir que hay cepas con diferente capacidad de solubilizar P. La mayor capacidad de solubilización *in vitro*, fue con la cepa MN108, mientras que *in vivo* que fue con la cepa MN139.
- Por lo tanto, la inoculación con la cepa MN139 solubilizadoras de P, puede ser una buena alternativa para la producción de trigo, ya que puede aumentar los rendimientos. Sin embargo, es menester señalar, que el potencial de dicha inoculación no es comparable a aquel que es posible obtener con aporte de fertilizantes fosforados solubles.
- En la medida que el costo de aplicación de bacterias solubilizadoras de P no compense el balance entre disminución del rendimiento-costo de aplicación de P por fertilización no se podrá implementar en los sistemas de producción.

## 6. RESUMEN

Se seleccionaron diez cepas bacterianas nativas con capacidad de solubilizar fósforo (P), aislada de la rizósfera de *Rubus constrictus*, *R. ulmifolius* y *Berberis microphylla*, de un suelo extremadamente pobre en P y con poca intervención del hombre. Esto se llevó a cabo a través de una prueba de solubilización *in vitro* por la producción de halo alrededor de la colonia en el medio agar Pikovskaya.

Las cepas seleccionadas fueron del género *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Serratia*, donde las primeras presentaron mayor capacidad de solubilizar P.

Tres de las mejores cepas solubilizadoras de P, se encapsularon y se sembraron junto al trigo variedad Pandora. A la vez hubo una co-inoculación con bacterias solubilizadoras de P y una bacteria fijadora de N. Esto se sembró en un suelo extremadamente pobre en P y con dos niveles de roca fosfórica Carolina del Norte, un tratamiento sin inoculación de bacterias y además de un control con superfosfato triple.

En las cosechas de trigo ningún tratamiento superó al control, con adición de fertilizante soluble.

Los mejores resultados en los parámetros de materia seca se obtuvieron con la co-inoculación y con aporte de roca fosfórica, pero con respecto al rendimiento, tratamiento con la bacteria MN139 y con aporte de roca fosfórica, fue el mejor.

## SUMMARY

Ten bacterial strains with capacity to solubilize phosphorus were selected, isolated from the rhizosphere of *Rubus constrictus*, *R. ulmifolius* and *Berberis microphylla*, out of a soil extremely poor in phosphorus and with little human intervention. This was made through an *in vitro* solubilization test by halo production around the colony in the Pikovskaya agar medium.

The selected strains belong to the *Pseudomonas*, *Klebsiella* and *Serratia* genus in which the first two showed greater capacity of solubilizing phosphorus.

Three of the best phosphorus solubilizing strains were encapsulated and planted next to the Pandora variety wheat. At the same time, there was an inoculation with phosphorus solubilizing bacteria, plus nitrogen holding bacteria. This was planted on a soil extremely poor on phosphorus with two levels of North Carolina phosphoric rock, a treatment without bacteria inoculation, plus a triple superphosphate control.

On wheat crops, no treatment overcame control with soluble fertilizer.

The best results on the parameters of dry matter were obtained with the co-inoculation and support of phosphoric rock, but in terms of performance, the treatment with bacteria MN139 with support of phosphoric rock was the best.

## 7. BIBLIOGRAFIA.

- ALAM, S., KHALIL, S., AYUB, N. y RASHID, M. 2002. *In Vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology* 4: 454-458.
- ALEXANDER, M. 1961. *Introduction to soil microbiology*. 3ª ed. John Wiley and sons. New York, USA. 472pp.
- BERGEY, D. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Editado por John. G. Halt. Philadelphia, USA. 787 pp.
- CASADO, A. y FERNÁNDEZ, M. 1998. Estudio "in vitro" sobre la fertilización natural de pastizales. *Suelos de la sierra de Guadarrama. Edafología* 5: 121-128.
- CRACOGNA, M., IGLESIAS, M., DIAZ, I., GONZALES, N. y CARBAJAL, M. 2003. Utilización de *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fósforo en el cultivo de trigo. Cátedra de Micribiología Agrícola. Facultad de Cs. Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
- De FREITAS, R. y GERMIDA, J., 1990. Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Can. J. Microbiol* 36: 265-272.
- DERY, P y ANDERSON, B. 2007. Peak phosphorus. *Energy bulletin*. <<http://energybulletin.net/node/33164>>. (Jun. 2008)
- DOMINGUEZ, A. 1997. *Tratado de fertilización*. 3ª ed. Mundi-prensa. Madrid, España. 613 p.

- DRECCER, M., RUIZ, R., MADDONNI, G y SATORRE, E. 2004. Bases ecofisiológica de la nutrición en los cultivos de grano. *In: Producción de granos, bases funcionales para su manejo.* Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires, Argentina. pp 479-497.
- EDI-PREMONO, M.A. MOAWAD, y P.L.G. VLECK, 1996. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomona putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonasian J. Crop Sci.* 11: 13-23.
- EFMA. European fertilizers manufactures association. 2000. Understanding phosphorus and its use in agricultura. <<http://www.efma.com>>. (sep. 2006).
- FACCINI, G., GARZÓN, S., MARTÍNEZ, M. y VARELA, A. S/A. Evaluation of the effect of a dual inoculum of phosphate solubilizing bacteria and *Azotobacter chroococcum*, in creole potato (papa "criolla") (*Solanum phureja*) variety "yema de huevo". School of science. Bacteriology department, Pontificia Universidad Javerana. Colombia.
- FAO. Food and agriculture organization of the united nations. 2007. Glosario de la gestión integrada de los nutrientes. <<http://www.fao.org>> (ene. 2008).
- FAO. Food and agriculture organization of the united nations. 2007. Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sustentable. Roma, Italia. 155p.
- GAIND, S. y GAUR, A. 1989. Effect of pH on phosphate solubilization by microbes. *Curr. Sci.* 58: 1208-1211.
- KHAN, M., ZAIDI, A. y WANI, P. 2006. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. *Agron. Sustain. Dev.* 26.
- KHALID, A., ARSHAD, M. y ZAHIR, Z. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology* 96: 473–480.

- KUMAR, V. y NARULA, N. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergences of wheat as affected by *Azotobacter choococum* mutants. *Boil. Ferttil. Soils* 28: 301-105.
- MADDONNI, G., RUIZ, R., R VILARIÑO, P. y GARCIA, I. 2004a. Fertilización en los cultivos para grano. *In: Producción de granos, bases funcionales para su manejo*. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires, Argentina. pp 499-557.
- MADDONNI, G., VILARIÑO, P. y GARCIA, I. 2004b. Dinámica de los nutrientes en el sistema suelo-planta. *In: Producción de granos, bases funcionales para su manejo*. Facultad de Agronomía. Universidad de B. A., Argentina. pp 441-477.
- MIKANOVA, O. y NOVAKOVA, J. 2002. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. *Rostlinná výroba* 48: 397-400.
- MONTECINOS, C. 2003. Manejo biológico del fósforo en el suelo. <<http://www.clades.cl>>.
- MORENO, L., NEVARRETE, P. y VIRGOS, L. 1998. Conceptos básicos de microbiología de aguas subterráneas. < <http://aguas.igme.es/igme/homec.htm>>.
- PRASAD, R. y POWER, J. 1997. Soil fertility management for sustainable agricultura. Lewis publisher. United States of America. 356 p.
- REYES, I. 1991. Cuantificación de microorganismos solubilizadoras de fosfatos en suelos del yacimiento de roca fosfórica de Monte Fresco. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)*. 17: 373-379.
- RIZOBACTER, 2004. Desarrollo de la aplicación de *Pseudomonas* solubilizadoras de fósforo. < <http://www.rizobacter.com.ar>>. (23-ene-2007).



- SALANTUR, A; OZTURK, A; AKTEN, S. 2006. Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant Soil Environment* 52: 111-118.
- SAHIN, F., CAKMAKCI, R. y KANTAR, F. 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil* 265: 123-129.
- SCHREINER, R., MIHARA, K., McDANIEL, H. y BETHLENFALVAY, G. 1997. Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant and Soil* 188: 199-209.
- SHARMA, S.N. y PRASAD, R. 2003. Yield and P uptake by rice and wheat grown in a sequence as influenced by phosphate fertilization with diammonium phosphate and Mussoorie rock phosphate with or without crop residues and phosphate solubilizing bacteria. *Journal of Agricultural Science* 141: 359-369.
- SHARMA, S.N., RAY, S.B., PANDEY, S.L. y PRASAD, R. 1983. Effect of irrigation, pyrites and phosphobacteria on the efficiency of rock phosphate applied to lentils. *J. Agric. Sci.* 101: 467-472.
- SHEKHAR, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Letters* 170: 265-270.
- SLAFER, G., MIRALLES, D., SAVIN, R., WHITECHURCH, E. y GONZALEZ, F. 2004. Ciclo ontogenico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en trigo. *In: Producción de granos, bases funcionales para su manejo.* Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires, Argentina. pp 99-132.
- WALKER, N. 1975. *Soil microbiology.* John Wiley and sons Publisher. New York, USA. 262 pp.

**ANEXOS**

**ANEXO 1. Composición del medio agar P Pseudomona base**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
20 g	Peptona de gelatina
3 g	Cloruro de magnesio hexahidratado
10 g	Sulfato potasico
12,6 g	Agar-agar
10 ml	Glicerina
1 L	Agua

**pH: 7,2 ± 0,1****ANEXO 2. Composición del medio agar nutritivo.**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
5 g	Peptona de caseína
3 g	Extracto de carne
12 g	Agar-agar
1 L	Agua

**pH: 7,0 ± 0,2****ANEXO 3. Composición del medio AT salts**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
10 g	Glucosa
10,9 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
1 g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,16 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,005 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,011 g	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,002 g	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
15 g	Agar-agar
1 L	Agua

**pH: 7 ± 0,2**

**ANEXO 4. Composición del medio PGY (Peptona-glucosa-extracto de levadura)**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
10 g	Peptona de caseína
5 g	Glucosa
1 g	Extracto de levadura
15 g	Agar-agar
1 L	Agua

**pH: 7± 0,2**

**ANEXO 5. Composición del medio Pikovskaya (PVK).**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
10 g	Glucosa
5 g	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
0,5 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,2 g	NaCl
0,1 g	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O
0,2 g	KCl
0,5 g	Extracto de levadura
0,002 g	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O
0,002 g	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O
15 g	Agar-agar
1 L	Agua

**pH: 7±0,2**

**ANEXO 6. Composición del medio agar peptona (AP).**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
3 g	Extracto de carne
5 g	Cloruro de sodio NaCl
10 g	Peptona de caseína
20 g	Agar-agar
1 L	Agua

**ANEXO 7. Composición del caldo peptona (CP).**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
3 g	Extracto de carne
5 g	Cloruro de sodio NaCl
10 g	Peptona de caseína
1 L	Agua

**ANEXO 8. Composición del medio agar papa dextrosa**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
39 g	APD Merck
1 L	Agua

**ANEXO 9. Composición del medio Agar King B**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
20 g	Peptona de caseína
6 g	Sulfato de magnesio
3 g	Fosfato de potasio bibásico
20 g	Agar-agar
15 g	Glicerol
1 L	Agua destilada

**ANEXO 10. Composición del medio Agar King A.**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
20 g	Peptona
10 g	Glicerol
10 g	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1,4 g	MgCl <sub>2</sub>
15 g	Agar-agar
1 L	Agua destilada

**ANEXO 11. Composición del medio Agar citrato Simmons.**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
0,2 g	Sulfato magnésico
1 g	Fosfato monoamónico
1 g	Fosfato dipotásico
2 g	Citrato sódico
5 g	Cloruro sódico
0,08 g	Azul de bromotimol
15	Agar-agar
1 L	Agua destilada

**pH: 6,9****ANEXO 12. Composición del medio de cultivo OF.**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
2 g	Peptona de caseína
5 g	Cloruro de sodio
0,3 g	Fosfato dipotasico
0,03 g	Azul bromotimol
2,5 g	Agar-agar
1 L	Agua destilada

**ANEXO 13. Composición del medio Agar urea de Christensen.**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
1 g	Peptona
1 g	Glucosa
5 g	Cloruro de sodio
2 g	Fosfato monopotasio
20 g	Urea
0,012 g	Rojo fenol
15 g	Agar-agar
1 L	Agua destilada

**pH: 6,8**

**ANEXO 14. Composición del medio TSI (triple azúcar, hierro).**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
3 g	Extracto de carne
3 g	Extracto de levadura
15 g	Peptona
5 g	Proteasa peptona
10 g	Lactosa
10 g	Sacarosa
1 g	Glucosa
5 g	Cloruro de sodio
0,2 g	Sulfato ferroso
0,3 g	Tiosulfato de sodio
12 g	Agar-agar
0,024 g	Rojo fenol
1 L	Agua destilada

**pH: 7,4 ± 0,2****ANEXO 15. Composición del medio Agar con almidón.**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
3 g	Extracto de carne
10 g	Almidón soluble
12 g	Agar-agar
1 L	Agua destilada

**pH:7,5****ANEXO 16. Composición del medio gelatina nutritiva.**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
3 g	Extracto de carne
5 g	Peptona
120 g	Gelatina
1 L	Agua destilada

**pH: 6,8 a 7**

**ANEXO 17. Composición del medio MIO.**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
31 g	MIO CONDA
1 l	Agua destilada

**pH: 6,5 ± 0,2**

**ANEXO 18. Composición del medio LIA.**

<b>Cantidad</b>	<b>Compuesto</b>
32 g	MIO MERCK
1 L	Agua destilada

**pH: 6,7 ± 0,2**

**ANEXO 19. Valores promedios del rendimiento del trigo medido en kilogramos por hectárea y quintales métricos por hectárea, para diferentes tratamientos del tercer corte.**

<b>Tratamientos</b>	<b>Rendimiento del trigo</b>	
	<b>Kg/ha</b>	<b>qqm/ha</b>
CONTROL	2563,3	25,6
C0 RF1	171,5	1,7
C0 RF0	43,0	0,4
C70 RF1	696,8	7,0
C70 RF0	220,5	2,2
C108 RF1	367,8	3,7
C108 RF0	408,5	4,1
C139 RF1	1205,3	12,1
C139 RF0	766,3	7,7
C200 RF1	1014,0	10,1
C200 RF0	273,0	2,7