

**Aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo de  
un Andisol y su evaluación en condición de invernadero  
utilizando el arroz (*Oryza sativa*) como planta indicadora**

Paola Lucía Vargas Barrantes

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN  
INGENIERÍA AGRONÓMICA CON ÉNFASIS EN FITOTECNIA

ESCUELA DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

2016

**Aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo de un Andisol  
y su evaluación en plantas de arroz (*Oryza sativa*).**

Paola Lucía Vargas Barrantes

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN  
INGENIERÍA AGRONÓMICA CON ÉNFASIS EN FITOTECNIA

---

Lic. Leida Castro Barquero

Directora de Tesis

---

Ph.D. Lidieth Uribe Lorío

Miembro del Tribunal

---

M.Sc. Róger Armando Fallas Corrales

Miembro del Tribunal

---

Ph.D. Eric Guevara Berger

Director de la Escuela

---

B.Sc. Paola Lucía Vargas Barrantes

Sustentante

## **DEDICATORIA**

A mis padres que me dieron la oportunidad de estudiar y lograr llegar hasta aquí en mi carrera profesional, lo que tengo se los debo a ellos.

A todas aquellas personas que trabajan la tierra con amor y nos permiten tener nuestros alimentos cada día en nuestra mesa, que cada aporte a la agricultura llegue a la mano de los agricultores y sea utilizado para el bien de todos forjando una agricultura con amor y respeto cada vez más grande por la naturaleza.

## AGRADECIMIENTO

A la profe Lic. Leida Castro Barquero, directora de tesis, por brindarme la oportunidad y la confianza de trabajar en este proyecto. Por toda la ayuda, atención, dedicación y paciencia que tuvo conmigo durante el desarrollo de esta investigación, me siento enormemente agradecida.

A Rebeca Vargas, Rogelio Villegas y Rodolfo Jiménez, que me ayudaron en las diferentes etapas del proyecto con la obtención de materiales, datos e información, me siento de verdad muy agradecida ya que fueron un enorme apoyo.

A la profe Ph.D. Lidieth Uribe Lorío, y los profes M.Sc. Róger Armando Fallas Corrales y Ph.D. Carlos Henríquez Henríquez, miembros del comité de tesis, por su dedicación y valiosos aportes para el desarrollo del documento de la presente investigación.

Al profe Ph.D Paul Esker, por su ayuda en el aspecto estadístico de la investigación, por su amabilidad y paciencia. A Michael González Arce por siempre estar dispuesto a ayudar y en este caso ayudarme también en la parte estadística de la investigación, gracias siempre.

Al Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), especialmente a los Laboratorios de Microbiología Agrícola y el de Suelos y Foliare, por toda la ayuda brindada en su momento para facilitar y permitirme trabajar en ellos, además de la ayuda en el procesamiento y análisis de las diferentes muestras y procedimientos realizados en el transcurso de esta investigación.

A Tite, Jaime y Viviana que me apoyaron en esta etapa de mi vida, me ayudaron, acompañaron, aconsejaron y facilitaron mi carga para lograr llegar hasta acá, no tengo como agradecerles.

¡Gracias de corazón!

## TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS.....	7
INDICE DE CUADROS.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
OBJETIVOS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
MARCO TEÓRICO.....	16
<b>I. P en el suelo.....</b>	<b>16</b>
<b>II. P en suelos Andisoles.....</b>	<b>17</b>
<b>III. Papel de los microorganismos en la disponibilidad del P para las plantas.....</b>	<b>19</b>
<b>IV. Función del P en las plantas.....</b>	<b>21</b>
<b>V. Absorción de P por parte de las plantas.....</b>	<b>22</b>
<b>VI. Microorganismos solubilizadores de P.....</b>	<b>25</b>
<b>VII. Enzimas involucradas en el proceso de solubilización de P.....</b>	<b>27</b>
<b>VIII. Asociaciones entre microorganismos solubilizadores de P y fijadores de N.....</b>	<b>28</b>
<b>IX. Uso de microorganismos solubilizadores de P en otros países.....</b>	<b>29</b>
METODOLOGÍA.....	31
Localización.....	31
Aislamiento de microorganismos.....	31
Pruebas de solubilización de fósforo in vitro.....	34
Ensayo en invernadero.....	38
Toma de datos.....	42
Sobrevivencia de Microorganismos y determinación del P soluble en el Suelo.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
Aislamiento de microorganismos.....	46
Pruebas de solubilización de P in vitro.....	47
Evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo a nivel de invernadero.....	<b>58</b>
Variables evaluadas en ensayo de invernadero.....	60
Peso fresco y seco radical.....	61
Longitud de la raíz principal.....	64

Densidad longitudinal radical.....	65
Índice raíz/tallo.....	66
CONCLUSIONES .....	77
RECOMENDACIONES .....	78
LITERATURA CONSULTADA.....	79
ANEXOS.....	93

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incubación del mantillo de bosque. San Pedro, San José. 2015. ....	32
Figura 2. Dilución seriada para el aislamiento de microorganismos. San Pedro, San José. 2015....	33
Figura 3. A) Material utilizado para realizar las diluciones. B) Selección de los microorganismos obtenidos con las diluciones seriadas, que presentaron capacidad de solubilizar fósforo. San Pedro, San José. 2015. ....	33
Figura 4. Platos utilizados en las pruebas in vitro para medir la capacidad solubilizadora de P de los hongos. San Pedro, San José. 2015. ....	34
Figura 5. Evaluaciones in vitro de solubilización de fósforo de los hongos aislados del suelo andisol. San Pedro, San José. 2015. ....	35
Figura 6. A) Caldo bacteriano a la izquierda comparado con un estándar McFarland a la derecha. B) Materiales para las inoculaciones y diluciones seriadas de bacterias y levaduras. San Pedro, San José 2015. ....	36
Figura 7. Caldos bacterianos y de levaduras filtrados luego de 7 días de haber sido inoculados. San Pedro, San José. 2015. ....	37
Figura 8. A) Siembra de almácigo de arroz Palmar 18 y B) su posterior trasplante a celdas de 200cc para conformar las repeticiones. San Pedro, San José. 2015. ....	39
Figura 9. A) Diseño irrestricto al azar utilizado en el ensayo B) Ordenamiento de las unidades experimentales según los tratamientos utilizados en el ensayo en invernadero. San Pedro, San José. 2015. ....	40
Figura 10. Parte aérea de plantas de arroz correspondientes a los diferentes tratamientos del ensayo: A) Testigo, B) Bacteria, C) Hongo, D) Levadura, E) Testigo de <i>Azospirillum oryzae</i> , F) Bacteria+Hongo+Levadura+ <i>Azospirillum oryzae</i> , G) Levadura+ <i>Azospirillum oryzae</i> , H) Bacteria+ <i>Azospirillum oryzae</i> , I) Hongo+ <i>Azospirillum oryzae</i> San Pedro, San José. 2015. ....	42
Figura 11. Medición y pesaje de parte aérea de plantas de arroz correspondientes a los diferentes tratamientos del ensayo. San Pedro, San José. 2015. ....	43
Figura 12. A) Raíces de plantas de arroz una vez cosechada la parte aérea. B) Raíces de plantas de arroz correspondientes al tratamiento testigo una vez lavadas y secas. San Pedro, San José. 2015. ....	43
Figura 13. Platos con medio de solubilizadores de P, correspondientes a la determinación del Numero más probable (NMP) en los tratamientos Testigo (T), Bacteria (B), Levadura (L), Testigo de <i>Azospirillum sp. J1</i> (T.A) y Hongo (H) utilizados en el ensayo en invernadero. San Pedro, San José. 2015. ....	45
Figura 14. Microorganismos aislados del suelo Andisol elegido. A) Selección de microorganismos por medio de la aparición de halo color amarillo. B) Re aislamiento y purificación de los microorganismos con esta capacidad. San Pedro, San José, 2015. ....	46
Figura 15. Pruebas de solubilización de P en hongos, a los 3 y 5 días después de la inoculación. A) HRR-20, repetición 1 y 2 a los 3 días de la inoculación, B) HRR-20, repetición 1 y 2 a los 5 días de la inoculación. San Pedro, San José. 2015. ....	49
Figura 16. Crecimiento de halo de solubilización de hongos en prueba in vitro. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	52

Figura 17. Pruebas de solubilización de P para bacterias y levaduras, a los 7 días después de la inoculación en condiciones de 27°C de temperatura y 200rpm de agitación. A) Levadura LRR-9, B) Bacteria BRR-19 y C) Testigo. San Pedro, San José. 2015. ....	53
Figura 18. pH del medio en las pruebas de solubilización de las bacterias evaluadas <i>in vitro</i> , a los 7 días después de la inoculación. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	54
Figura 19. pH del medio en las pruebas de solubilización de las levaduras evaluadas <i>in vitro</i> , a los 7 días después de la inoculación. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	55
Figura 20. Concentración de fósforo en solución para las pruebas de solubilización de bacterias evaluadas <i>in vitro</i> , a los 7 días después de la inoculación. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	56
Figura 21. Concentración de fósforo en solución para las pruebas de solubilización de levaduras evaluadas <i>in vitro</i> , a los 7 días después de la inoculación. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	57
Figura 22. Tinción de Gram y observación microscópica realizada a los microorganismos seleccionados para el ensayo en invernadero. A) BRR-19 (bacteria Gram negativa) y B) LRR-9 (levadura); C) conidióforo y cabeza aspergilar de HRR-20 (hongo). Todas las observaciones realizadas por medio de microscopio con aumento de 100x. San Pedro, San José. 2015. ....	59
Figura 23. Peso fresco y seco radical de plantas de arroz de 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	62
Figura 24. Longitud de raíz principal de plantas de arroz de 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos evaluados en invernadero. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	64
Figura 25. Densidad longitudinal radical (cm/cc) de plantas de arroz de 102 días, bajo diferentes tratamientos evaluados en invernadero. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	66
Figura 26. Relación de pesos frescos de raíz sobre pesos frescos de parte aérea (Índice raíz/tallo en fresco) de plantas de arroz de 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos evaluados en invernadero. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	67
Figura 27. Relación de pesos secos de raíz sobre pesos secos de parte aérea (Índice raíz/tallo en seco) de plantas de arroz de 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos evaluados en invernadero. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	69
Figura 28. Población de microorganismos presentes en el suelo 3 meses después de la cosecha de las plantas de arroz. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	74
Figura 29. Fósforo en solución presente en los suelos 3 meses después de la cosecha de las plantas de arroz, según el microorganismo presente. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna. ....	75



## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración de los caldos microbianos con los cuales se inocularon las pruebas in vitro de bacterias y levaduras. San Pedro, San José 2015.....	36
Cuadro 2. Análisis químico del suelo de Rancho Redondo utilizado para el ensayo en invernadero. San Pedro, San José. 2015.....	38
Cuadro 3. Concentración de las suspensiones microbianas aplicadas a las plantas de arroz en las diferentes inoculaciones realizadas. San Pedro, San José. 2015. ....	41
Cuadro 4. Microorganismos aislados de un suelo Andisol con capacidad solubilizadora de fósforo (P). San Pedro, San José. 2015.....	48
Cuadro 5. Crecimiento de halo de solubilización de hongos en prueba in vitro. San Pedro, San José. 2015.....	50
Cuadro 6. Pesos frescos, pesos secos y altura de parte aérea de plantas de arroz a los 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos probados en invernadero. San Pedro, San José. 2015.....	61
Cuadro 7. Análisis foliar de plantas de arroz a los 102 días después de la siembra, bajo diferentes tratamientos probados en invernadero. San Pedro, San José. 2015.....	70

## RESUMEN

Se aislaron microorganismos solubilizadores de P de un mantillo de bosque ubicado en un Andisol de Rancho Redondo, San José. Posteriormente se diseñó una metodología para evaluar y cuantificar de manera in vitro la capacidad de los mismos para solubilizar P utilizando el medio Osorio y Habte (2001); y a nivel de invernadero, utilizando el suelo Andisol de Rancho Redondo de alta retención de P y arroz como planta indicadora.

Se aislaron hongos, bacterias y levaduras. En el caso de los hongos, para la evaluación in vitro se midió el crecimiento del halo de solubilización en placas petri con el medio de cultivo en forma sólida; mientras que para las bacterias y levaduras se utilizó el medio en forma líquida y se evaluó el cambio de pH del medio, así como la cantidad de P en solución. Se seleccionaron 29 cepas con potencial para la solubilización de P in vitro.

A partir de las pruebas in vitro se seleccionó a *Aspergillus flavus* (Hongo, HRR-20), *Pseudomonas fragi* (Bacteria, BRR-19) y *Pichia anomala* (Levadura, LRR-9), para ser probados bajo condiciones de invernadero. Las plantas de arroz se cosecharon a los 102 días después de la siembra y se evaluó el peso fresco y seco de parte aérea y radical, altura de planta, longitud de raíz principal, densidad longitudinal radical, índice raíz/tallo y fósforo foliar. Además, tres meses después de la cosecha, se determinó en el suelo la población de microorganismos solubilizadores de P, así como la cantidad de P disponible en el suelo en los diferentes tratamientos.

Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos en lo correspondiente al crecimiento radical, no así del crecimiento de follaje. El tratamiento de *Aspergillus flavus* junto con *Azospirillum oryzae* (H+A) fue donde se obtuvieron menores densidades de raíz y menores longitudes de raíz. Este mismo tratamiento (H+A) y los correspondientes a los microorganismos individualmente (H y T.A) fueron los que obtuvieron los mayores pesos secos de raíz y los mayores índices raíz/tallo en seco. Pese a lo anterior, los análisis foliares no mostraron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a la cantidad de P foliar. Este resultado se relacionó con las características mineralógicas del Andisol utilizado.

En lo correspondiente a la sobrevivencia de los microorganismos y la cantidad de fósforo disponible en el suelo después del ensayo, se obtuvo que para ambos casos el tratamiento de *Aspergillus flavus* presentó las cantidades más altas tanto de microorganismos solubilizadores de P, como de P disponible en el suelo.

## INTRODUCCIÓN

En Costa Rica, el orden de suelos conocido como Andisoles ocupa el tercer lugar en cuanto a extensión se refiere, con aproximadamente 6306 km<sup>2</sup>, después de los Ultisoles y los Inceptisoles (Mata, *et al.* 2013).

Aunque esta área corresponde al 15,46% del área nacional (Mata, *et al.* 2013) los suelos de este orden albergan la mayoría de la producción cafetalera del país, al igual que la producción de caña de azúcar, hortalizas, productos de exportación tales como flores, helechos y fresas. Así como gran parte de la ganadería de leche de altura, y en la parte Norte y Atlántica del país donde se cuenta con estos suelos se ha desarrollado la expansión del cultivo de banano, además de raíces, tubérculos y ornamentales (Bertsch, 1995).

Después del Nitrógeno (N) y el Azufre (S), el Fósforo (P) es el elemento más limitante en los trópicos, ya que es probablemente el nutriente con mayor estabilidad dentro del suelo, debido a que no se pierde por lixiviación o volatilización, y presenta una baja solubilidad, por lo tanto menor disponibilidad para las plantas; provocando deficiencias en las mismas (Bertsch, 1995). El P es un elemento limitante en más del 30% de los suelos cultivables del mundo y las fuentes de acceso conocidas de este elemento, están siendo consumidas a una velocidad que probablemente generará escasez dentro de pocos años (Raghotama, 1999; Vance, *et al.* 2003).

La poca solubilidad del P hace que el contenido total de este elemento en el suelo no esté relacionado directamente con su disponibilidad (Sanzano, 2013) y esto es particularmente importante en los suelos Andisoles. Nutricionalmente, este orden de suelos en el país puede catalogarse como moderadamente fértil y como suelos que se mantienen “jóvenes” debido a su renovación constante con cenizas volcánicas (Bertsch, 1995). Para el caso de los Andisoles, el 74% de las muestras analizadas para este suelo en el país, presentaron deficiencias de P (Bertsch, 1995); debido a la alta fijación, que en algunas ocasiones puede llegar fácilmente a 92% (Henríquez, 2005).

Los Andisoles presentan como arcillas dominantes las alofanas. Este tipo de arcillas suele hidratarse, formando complejos organominerales difíciles de descomponer, debido a que se liga con materia orgánica y fija aniones (Bertsch, 1995).

En Costa Rica, el contenido de P total en Andisoles puede oscilar entre 800 y 5500mg/L, sin embargo el P disponible está entre 6 y 161mg/L (Soto, 1998). Lo anterior, sumado a que el P aplicado en forma de fertilizante es rápidamente retenido por el suelo y en porcentajes bastante altos (más del 90% en algunos casos), hace que la disponibilidad de este elemento para las plantas sea baja, y que en este tipo de suelos específicamente, el P sea por lo general, el nutriente más limitante para la producción de los cultivos (Bertsch, 1995; Alvarado, *et al.* 2009).

Aunque las plantas contienen fósforo en cantidades muy bajas, este elemento presenta una alta limitación para la producción, debido a su baja disponibilidad en el suelo (Sanzano, 2013); por lo que aumentar la eficiencia en el uso de fertilizantes fosfatados (Fallas, 2013), además de mejorar la absorción de este elemento por parte de las plantas, se vuelve cada vez más necesario.

Este elemento brinda calidad y precocidad a los frutos, se encuentra tanto en tejidos jóvenes como en aquellos de mayor edad fisiológica, así como en órganos de reserva. Dentro de sus funciones está el acumular energía y combustible para todas las actividades metabólicas ya que forma parte del adenosín trifosfato (ATP) (Sanzano. 2013; Fallas, 2013).

En cuanto a la disponibilidad de este elemento para las plantas, los microorganismos del suelo juegan un papel determinante, ya que actúan sobre la dinámica del P y la consecuente disponibilidad para las mismas. Lo anterior se debe a que algunos son capaces de solubilizar fosfatos inorgánicos mediante la producción de ácidos orgánicos (Richardson, *et al.* 2009; Kucey, 1987), agentes quelantes (Whitelaw, 1999), disminución del pH de la solución del suelo (Richardson, *et al.* 2009; Whitelaw, 1999) y disposición de fosfatos contenidos en la materia orgánica del suelo, por medio de enzimas hidrolíticas como fosfonatasas, fosfatasas y fitasas (Cepeda, *et al.* 2005).

Por esta razón es que, los microorganismos solubilizadores de fósforo son una importante e interesante alternativa para el suplemento de este elemento a las plantas, ya sea para promover la utilización de aquel fósforo que se encuentra ya en el suelo o el que se adiciona en forma de fertilizante o abono (Cracogna, *et al.* 2003).

Este tipo de microorganismos utilizados como biofertilizantes o bioestimuladores, puede representar un componente importante para los sistemas agrícolas sustentables,

además de ser económicamente atractivo, viable y ecológicamente aceptable. Además permiten reducir el uso de insumos externos y aprovechar mejor aquellos recursos internos como lo es el fósforo que se encuentra fijado en el suelo (López, et al. 2008).

Debido a esto, el presente trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar una metodología para aislar y evaluar microorganismos capaces de solubilizar fósforo a partir de formas poco disponibles para la planta, utilizando arroz como planta indicadora y un Andisol como suelo de estudio.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL.**

-Aislar y evaluar microorganismos capaces de solubilizar fósforo a partir de formas poco disponibles para la planta, en un Andisol de Costa Rica, utilizando el arroz como planta indicadora.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

-Aislar microorganismos solubilizadores de P de un suelo Andisol en la zona de Rancho Redondo, San José.

-Desarrollar in vitro una metodología para evaluar la capacidad solubilizadora de los microorganismos encontrados y seleccionar aquellos más eficientes.

- Ensayar una metodología a nivel de invernadero, para evaluar los microorganismos aislados en cuanto a su capacidad para solubilizar P de un suelo Andisol, utilizando plantas de arroz como cultivo indicador.

-Evaluar la eficiencia en la absorción de fósforo de las plantas de arroz bajo la co-inoculación de los microorganismos solubilizadores de fósforo seleccionados y *Azospirillum oryzae* PCJ1 como bacteria fijadora de nitrógeno.

## MARCO TEÓRICO

La estructura y funcionalidad de las raíces pueden determinar la capacidad de acceso de las plantas a los diferentes nutrientes, dentro de los cuales se encuentra el fósforo. Entre las estrategias que poseen las plantas para adquirir nutrientes está, la acidificación de la rizósfera por medio de la extrusión de protones y de exudados de la raíz, que van a depender tanto del nutriente en cuestión, la especie de la planta y el tipo de suelo (Richardson, *et al.* 2009).

De acuerdo a la capacidad metabólica que posean las raíces de secretar exudados, así se va a ver modificada la actividad microbiana en el suelo. Lo anterior ocurre de manera inversa ya que la actividad de los microorganismos pueden estimular el crecimiento y desarrollo de la planta por diferentes mecanismos entre los que está, una mejor disponibilidad de nutrimentos (Alarcón y Ferrera, 2000).

En el caso del P, su disponibilidad puede aumentar debido a la extrusión de protones realizada por la raíz, que está asociada a la reducción de los sitios de adsorción del P dentro del suelo, alterando la cinética de adsorción-desorción de los ortofosfatos (Hinsinger y Gilkes, 1996; Gahoonia y Nielsen, 1992; Hinsinger, 2001; Neumann y Römheld, 2007); y a procesos microbianos de mineralización (Bar-Yosef, *et al.* 1999;-Awasthi, *et al.* 2011).

### **I. P en el suelo**

El contenido total de P de un suelo va a depender de tres factores: el material parental, el grado de desarrollo del suelo y el contenido de materia orgánica del mismo (Bertsch, 1982,1995), además del historial de aplicaciones que se le haya realizado al suelo (Soto, 1998). Así, generalmente, a mayor grado de meteorización, menor contenido de P total en el suelo, y a mayor cantidad de materia orgánica, mayor contenido de P orgánico y por lo tanto mayores contenidos de P total (Bertsch, 1982,1995; Alvarado, *et al.* 2001; Soto, 1998; Henríquez, 2005; Ospina, 1974; Canessa, *et al.* 1986, 1987).

En el suelo se pueden encontrar 3 formas principales de fósforo (P): fósforo inorgánico, el cual representa del 35-70% del fósforo total; fósforo orgánico, que corresponde del 30-65% del P total del suelo según Shen, *et al.* (2011) y del 20-80% según



Raghothama, (1999); y el fósforo soluble, el cual es el que se encuentra disponible para las plantas, es decir, aquel fósforo que las plantas pueden absorber para realizar sus funciones metabólicas (Patiño, 2010).

En el suelo, el fósforo disponible puede encontrarse en las distintas formas de ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) y como el ion fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), siendo su forma dominante en la solución del suelo, altamente dependiente del pH (Fallas, 2013; Abou Nohra, *et al.* 2007), ya que en un pH entre 2 y 7 predomina el  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , mientras que en un pH entre 7 y 12 predomina la forma  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Bertsch, 1995).

La fijación del fósforo (P) en el suelo está relacionada con las características físico-químicas que el suelo presente, como la cantidad de óxidos de hierro (Fe) y aluminio (Al), contenido de materia orgánica, de arcillas y de calcio (Ca) (Patiño, 2010), ya que este elemento se torna rápidamente en no disponible para las plantas, al formar complejos insolubles con estos cationes (Fe y Al en suelos ácidos; Ca en suelos alcalinos) (Abdú, 2006; Vance *et al.* 2003).

La retención del P en el suelo se da por medio de dos vías: adsorción de este elemento en la superficie de las arcillas y la precipitación del P con cationes de la solución del suelo (Bernal, 2010; Fallas, 2013; Fassbender, 1966).

La adsorción se presenta sobre las partículas coloidales del suelo, como la materia orgánica, las arcillas (Fassbender, 1966) y los óxidos e hidróxidos de hierro (Fe) y aluminio (Al) ya sea por atracción electrostática o por la sustitución de grupos hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) por el ion ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) (Bernal, 2010. Novais *et al.* 2007) generalmente en suelos ácidos (Shen, *et al.* 2011).

La precipitación se da cuando el P reacciona con el Fe, Al y Ca presentes en el suelo (Bernal, 2010) y forma fosfatos de baja solubilidad del tipo de las apatitas ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)\text{OH}$ ), estrengita ( $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), variscita ( $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y otros fosfatos complejos cristalizados o en su forma amorfa (Alvarado, *et al.* 2009).

## **II. P en suelos Andisoles.**

A pesar de que el P total en los Andisoles del país se encuentra en cantidades muy elevadas (entre 800-5500 mg/L), las cantidades de P disponible para la planta son bastante

bajas (aproximadamente 6-161 mg/L) (Alvarado, *et al.* 2001). Este P disponible varía en cada uno de los subórdenes debido a la retención asociada a la mineralogía de las arcillas dominantes de cada uno (Canessa, *et al.* 1986).

Como consecuencia a lo anterior, es que este elemento representa la mayor limitante de los Andisoles, debido a que su alta fijación supera por lo general el 70% y llega fácilmente a valores de 95% (Bertsch, 1995). Además representa un problema en cuanto a las aplicaciones de fertilizante a los cultivos, ya que alrededor del 80% del P aplicado como fertilizante fosfatado, es fijado en el suelo (Cabalceta. 1993).

Alvarado, *et al* (2009), estudiaron el efecto residual de la aplicación de P como fertilizante en el cultivo de papa en un suelo Andisol de la zona de Cartago, aplicando dosis crecientes de fertilizantes por 1 y 2 años consecutivos. Los autores encontraron que la retención de P por parte del suelo fue de 93% y 91% durante el primero y segundo cultivo respectivamente.

Los suelos volcánicos de Costa Rica presentan una marcada acidez a diferencia de los demás Andisoles de Centroamérica, la cual se debe al régimen pluviométrico y el contenido de materia orgánica de los mismos (Fallas, 2013). En este tipo de suelos, el contenido de materia orgánica es generalmente alto, por lo que esta posee una gran importancia en el ciclaje del P, correspondiendo, el P orgánico a un 40% del P total (Henríquez, *et al.* 1992).

Martini (1976) y Alvarado, *et al* (2009) mencionan además, que conforme disminuye la cantidad de material amorfo en estos suelos existe una menor cantidad de P que puede ser fijado. Lo anterior sucede cuando aumenta el grado de meteorización y aquellos materiales amorfos comienzan a ser más cristalinos.

A pesar de que estos suelos presentan esta alta fijación de P, Alvarado, *et al* (2009) menciona que la retención de este nutriente es reversible, ya que la cantidad de P desorbido correlaciona con las formas de P lábil en los Andisoles, encontrando valores de desorción de 76-433mg/L en un período de 70 días (Soto, 1998), y de 20-40 mg/L en un período de 8 días (Henríquez, 2005).

Estos procesos de desorción para este elemento confirman la existencia de un continuo entre las formas de P disponibles y las formas de P sorbidas (no disponibles en la fase sólida del suelo), lo cual hace que sea arbitrario poder distinguir de manera permanente

las fracciones de P disponibles y no disponibles en un suelo, debido a la naturaleza tan dinámica que existe para este elemento (Frossard, *et al.* 2000).

El estudio de Henríquez (2005) sugiere por lo tanto, que existe una capacidad de restitución del P desorbido, el cual supera en mucho al valor de P disponible, que es cuantificado en el análisis de rutina. Lo anterior implica que, aunque los niveles de P en el suelo sean bajos (debido a la alta sorción del elemento en el suelo), el proceso de desorción podría mantener un suplemento significativo de P.

### **III. Papel de los microorganismos en la disponibilidad del P para las plantas.**

Los organismos del suelo están íntimamente involucrados en el ciclaje del P del suelo, ya que participan en la solubilización del P inorgánico y en la mineralización del P orgánico, además de inmovilizar también aquel fósforo disponible (Paul y Clark, 1996. Valenciano, 2014).

Paul y Clark (1996) indican que, aunque la biomasa de los microorganismos es menor que la de las plantas, la cantidad en porcentaje de P en los microorganismos es 10 veces mayor que el de las plantas. Se sabe también que los microorganismos son responsables de la inmovilización del P. Esta inmovilización es de corta duración y resulta beneficiosa para las plantas, ya que evita que este elemento sea fijado por mucho más tiempo en los minerales del suelo (Paul y Clark, 1996).

Los microorganismos tienen la capacidad de revertir el proceso de fijación de P y aumentar la mineralización del P orgánico, contribuyendo significativamente a la disponibilidad de este elemento para las plantas en el suelo (Richardson, *et al.* 2009).

Este proceso de mineralización lo logran por medio de la síntesis y liberación de ácidos orgánicos (Bar-Yosef, *et al.* 1999), compuestos fenólicos, protones y sideróforos (Awasthi, *et al.* 2011;).

Otros mecanismos para la solubilización de compuestos inorgánicos de P son, la excreción de protones debido a la asimilación de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) por los microorganismos (Kucey, 1983; Roos y Luckner, 1984; Abda-Alla, 1994; Illmer, *et al.* 1995; Asea, *et al.* 1988; Whitelaw, 2000) y la desorción de iones fosfato de los sitios de adsorción por

aniones orgánicos producidos por estos organismos o ya sea porque logran metabolizar rápidamente aquellos aniones producidos por la rizósfera y usarlos para la liberación de P a la solución del suelo (Richardson, *et al.* 2009).

Por otro lado, tienen la capacidad de quelatar aquellos elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos, como son el Fe, Al y el Ca, y que generan que el P inorgánico precipite; además, pueden asimilar directamente los fosfatos insolubles, acumulándolos en sus células y liberándolos posteriormente (Bobadilla y Rincón. 2008).

Se sabe que los aniones orgánicos liberados por las raíces de las plantas como el citrato, oxalato, malato, malonato acetato, lactato, etc., logran movilizar el P por medio de complejos húmicos-metálicos (Gerke. 1993), y se ha demostrado que los mismos aumentan la disponibilidad del P orgánico (Hayes, *et al.* 2000).

Además, la fracción de P orgánico del suelo debe ser desfosforilada por enzimas como la fosfatasa para que la planta pueda absorber este nutriente. Estas enzimas pueden ser producidas tanto por las raíces de las plantas (Hayes *et al.* 1999; Hübel, 1996; Li, *et al.* 1997; Tadano, *et al.* 1993) así como por los microorganismos del suelo (Richardson y Hadobas, 1997). No obstante, las contribuciones relativas de las fosfatasas a la hidrólisis del P orgánico son hasta el momento poco entendidas (Hayes, *et al.* 2000).

Sin embargo, el mecanismo más eficiente para la solubilización de P por parte de los microorganismos es el de producción de ácidos orgánicos, los cuales son producto del metabolismo microbiano por respiración oxidativa o por fermentación de sustratos carbonados. Los ácidos glucónico, oxálico, cítrico, láctico, tartárico y aspártico son los más comúnmente asociados a este proceso (Bernal, 2010; Richardson, *et al.* 2009); de estos, el ácido cítrico y oxálico son los que suelen ser más efectivos (Richardson, *et al.* 2009).

Un ejemplo de lo anterior, es el estudio realizado por Cordero *et al.* (2008) con *Pantoea* sp. en el cual indica que la producción de ácidos orgánicos provoca la disminución del pH del suelo, y éste puede ser el método de solubilización de P que utiliza la bacteria. En este estudio, el pH del medio descendió de 7 a 4,65, lo cual provocó que la cantidad de P solubilizado en el medio pasara de 0 a 1128µg P/mL.

Paul y Clark (1996) aseguran que la liberación de ácidos orgánicos puede jugar un papel importante en la solubilización de P, no obstante en un experimento realizado in vitro, se comparó el uso de los microorganismos con la adición de HCl al medio,

encontrándose una baja correlación entre los cambios de pH y la cantidad de P solubilizado. Lo anterior sugiere que el mecanismo de solubilización de fósforo puede no ser directamente la acidificación del medio o el suelo, sino la quelatación del Fe, Al y/o Ca por medio de los ácidos orgánicos, reduciendo el número de cationes disponibles para reaccionar con el P inorgánico (Paul y Clark, 1996).

Patiño (2010) menciona que la versatilidad que presenten los microorganismos para utilizar las diferentes fuentes de carbono (C), hacen de estos potenciales candidatos para ser utilizados como biofertilizantes en la agricultura.

Respecto a lo anterior, Patel *et al.* (2008) encontraron que aislamientos de *Citrobacter* sp. fueron capaces de crecer en medios de cultivo con sacarosa y fructosa como fuentes de carbono, generando en ambos casos ácido acético y además ácido pirúvico en el caso del crecimiento en fructosa. Por otro lado, utilizando la glucosa o maltosa como fuente de carbono, se reveló la producción de ácido glucónico por parte de la bacteria en estudio. El poder utilizar todas estas fuentes de carbono en la producción de ácidos orgánicos le confiere a esta bacteria gran versatilidad y mayor eficiencia en la solubilización de P del suelo.

En otro estudio, realizado en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*) se logró aislar a *Candida famata*, una levadura capaz de solubilizar fósforo en el suelo y que en este caso crece y utiliza fuentes simples de carbono como la glucosa, para este fin. Esta levadura no había sido reportada como solubilizadora de fósforo, pero se había reportado como biocontroladora de *Penicillium digitatum* (Becerra, et al. 2011).

#### **IV. Función del P en las plantas.**

El fósforo es uno de los nutrientes vegetales más importantes ya que forma parte de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP, regula procesos metabólicos, transfiere energía, forma parte de algunas enzimas y de procesos importantes como fotosíntesis, glicólisis, respiración, reacciones redox (Vance, *et al.* 2003), aporta energía durante la síntesis y transporte de carbohidratos en la planta, interviene en la división celular lo cual se refleja en un acelerado desarrollo de las raíces y estimulación en la formación de semillas (Echeverría, 2012).

Paul y Clark (1996) mencionan que las plantas deben utilizar parte de su energía en poder movilizar el P de la solución del suelo hasta el citoplasma, ya que la concentración en sus células es de 50-100 veces mayor que en el suelo.

Las deficiencias de este elemento dentro de la planta se pueden manifestar por bajas concentraciones en la solución del suelo, bajas tasas de difusión y baja capacidad de reposición de los niveles de fosfato en la solución (Richardson, *et al.* 2005). Una baja disponibilidad de este elemento, tiende a producir una mayor cantidad de antocianinas y activar un sistema de alta afinidad para transportar el elemento (Fallas, 2013; Schachtman, *et al.* 1998; Smith, *et al.* 2003; Plaxton y Tran, 2011).

Además, Ticoni y Abel (2004), mencionan que en el caso de plantas de *Arabidopsis*, estas son capaces de activar una serie de hidrolasas para reciclar el P de las estructuras orgánicas y propiciar el crecimiento de la planta.

## **V. Absorción de P por parte de las plantas**

Como se mencionó anteriormente, el P en la solución del suelo, se encuentra en las formas de ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) y como el ion fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). No obstante, las plantas pueden absorber este elemento solamente en sus formas inorgánicas, como ion ortofosfato primario ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  principalmente) y como ion fosfato secundario ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) de la solución del suelo (Richardson, *et al.* 2009; Patiño, 2010.).

Ambas formas presentan su mayor disponibilidad para las plantas a pH entre 5-6, son de lenta difusión y además presentan alta fijación al suelo, por lo que tienen una baja disponibilidad; lo que representa un factor limitante para el crecimiento vegetal y por lo tanto, también para el rendimiento de los cultivos (Shen, *et al.* 2011).

Por otro lado se sabe también que la absorción de este elemento por parte de la planta no depende únicamente del pH y factores físicos del suelo, sino también de aspectos fisiológicos que afectan la absorción de aniones, debido al co-transporte protón-anión del apoplasto al citoplasma (Marschner. 1995).

El P es un elemento que se puede movilizar dentro de la planta, y para ser absorbido por esta, el 90,9% de su movilización se da por medio de difusión, en respuesta a la gradiente de concentración del nutriente en el suelo, donde las partículas se mueven de

zonas de mayor concentración a zonas de menor concentración (zona cercana a la raíz donde se ha producido un déficit debido al consumo del elemento por parte de la planta). Seguido apenas con un 6,3% debido a flujo de masas, que consiste en el arrastre de los elementos con el agua que se mueve hacia la raíz por efecto de transpiración de la planta y un 2,8% por interceptación radical (Bertsch, 1995).

Según Shen, *et al* (2011) la concentración de P inorgánico en el suelo, rara vez excede los  $10\mu\text{M}$ ; Richardson, *et al* (2009) reporta concentraciones de 1-5  $\mu\text{M}$  de ortofosfato. Sin embargo, la concentración de P en los tejidos vegetales va de 5000-20,000 $\mu\text{M}$  (Shen, *et al.* 2011).

En algunos casos, el P presente en el suelo puede ser superior al requerido por las plantas, no obstante, su baja movilidad hace que éste no esté disponible para ellas (Shen, *et al.* 2011).

A pesar de lo anterior, las plantas han tenido que adaptarse a tomar el P a pesar de sus bajas concentraciones en el suelo; razón por la cual el crecimiento y la arquitectura de las raíces se ve influenciada por el contenido y disponibilidad de este elemento (Jungk, 2001). El 80% del P que las plantas toman del suelo, lo hacen por medio de los pelos radicales, razón por la cual, bajo condiciones deficientes, éstos adquieren tanta relevancia (Föhse, *et al.* 1991).

La biodisponibilidad de este elemento depende de la especie de la planta, estado nutricional del suelo y las condiciones ambientales (Khan, *et al.* 2007). Sobre todo se ve influenciado por cambios en el pH del suelo y la cantidad o tipos de exudados de la raíz (Richardson, 1994). La solubilidad del P depende de la disociación del  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y la forma que tenga en solución va a ser dependiente del pH. Un pH entre 5 y 6 favorece la absorción de este elemento por parte de la planta en su forma  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Schachtman, *et al.* 1998).

Por otro lado, se incrementa la disponibilidad del elemento con el aumento en la actividad microbiana del suelo, por lo que se puede afirmar que los microorganismos juegan un importante papel en la solubilización y dinámica del fósforo (P) dentro del suelo (Patiño, 2010.). Lo anterior se debe a que el P ligado a la materia orgánica debe pasar por un proceso de mineralización para ser absorbido y asimilado por las plantas, y este proceso lo llevan a cabo los microorganismos (Fallas, 2013).

De acuerdo a lo anterior se sabe también que la obtención de este elemento por parte de las plantas, se da en su mayoría proveniente del P orgánico, el cual es mineralizado por estos microorganismos por medio de enzimas como la fosfatasa (Paul y Clark, 1996; Fallas, 2013).

Bajo condiciones deficientes de este elemento en el suelo, la eficiencia de los microorganismos aumenta, por lo que la absorción de P por parte de las plantas es mayor, sobretodo, si tales organismos se encuentran presentes en mayores cantidades en la rizósfera (Khan, *et al.* 2007).

Richardson, *et al* (2009), menciona que se han visto mejorías en el crecimiento de las plantas y en su nutrición con P, atribuibles a los microorganismos solubilizadores de P, sin embargo, las respuestas en campo han sido más inconsistentes y difíciles de demostrar con respecto a la parte *in vitro*.

En un estudio realizado por Cordero, *et al.* (2008) con la bacteria *Pantoea* sp., la cual tiene la capacidad de solubilizar fosfatos y además, tiene características nitrificadoras; se mostró que al ser inoculada en plantas de rábano incrementó la presencia de P en las hojas.

Cordero, *et al.* (2008) también hace mención de un estudio realizado por El-Komy (2005), en el cual se inocularon plantas de trigo con *Pseudomonas striata* y *Bacillus polymyxa*, en el cual se dio un aumento de P en los tejidos de trigo en comparación con aquellas plantas que no fueron inoculadas con estos microorganismos.

Whitelaw, *et al* (1997) mencionan el caso de *Penicillium radicum*, el cual solubilizó P en medio de cultivo y promovió el crecimiento de trigo. No obstante la evidencia de que las plantas mejoraron su absorción de este elemento en respuesta a las inoculaciones, especialmente con la aplicación de fertilizantes fosfatados, fue posible solamente en invernadero. Sin embargo, la promoción del crecimiento de las plantas podría no estar necesariamente asociado a la solubilización de P por parte de los microorganismos, sino más bien a la producción de fitohormonas (Wakelin, *et al.* 2006).

También Paul y Clark (1996) menciona que el hongo *Penicillium bilaji* fue probado bajo condiciones de campo, en semillas de trigo, adicionándoles roca fosfórica. En este caso se demostró la solubilización de P y absorción del mismo por parte de las plantas, incrementando el crecimiento de las mismas.



A pesar de que Khan, *et al* (2007), menciona los microorganismos rizósfericos como organismos más eficientes para la absorción de P por parte de las plantas, Tejera, *et al* (2013) indica que bacterias endófitas con capacidad solubilizadora de P, pueden tener una mayor ventaja con respecto a los microorganismos rizosféricos, debido a que los primeros presentarían un reconocimiento molecular más específico con la planta, además de que tendrían mayor disponibilidad de nutrimentos dentro de la planta y están menos expuestos a las condiciones adversas del medio ambiente.

## VI. Microorganismos solubilizadores de P

Dentro de los microorganismos involucrados en este proceso (solubilización de P) se encuentran las bacterias, hongos, protozoos, nematodos y chromista, de los cuales, los hongos representan los mayores aportes en solubilización de este elemento, seguido de las bacterias (Patiño, 2010).

De los hongos que actualmente se conocen con esta propiedad, los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*, son los que presentan mayor capacidad de solubilización de P (Patiño, 2010; Gyaneshwar *et al.* 2002; Kucey, *et al.* 1989; Rodriguez y Frago, 1999; Subba- Rao, 1982; Whitelaw, 2000).

Estos géneros, según algunos autores, resultan más efectivos en la solubilización de fosfatos de hierro y aluminio, en comparación con los fosfatos de calcio (Kucey, 1983; Illmer y Schinner, 1995; Nahas, 2007; Whitelaw, *et al.* 1999).

Vera, *et al* (2002) lograron aislar también los géneros *Paecilomyces*, *Gliocladium* y *Gongronella*, e identificarlos como solubilizadores de P. De estos géneros, se encontró que la cantidad de colonias solubilizadoras de fosfatos de calcio fue mayor a la cantidad de colonias solubilizadoras de fosfatos de hierro, en contradicción a lo mencionado en el párrafo anterior. Los autores atribuyeron las diferencias, a las constantes de solubilización de cada uno de los fosfatos; donde el fosfato de calcio presenta una constante de  $2,18 \times 10^{-7}$ , mientras los fosfatos de hierro tienen una constante de  $1,35 \times 10^{-18}$  (Vera, *et al.* 2002).

En el caso de las bacterias, se conocen más géneros con capacidad solubilizadora de P, dentro de ellas *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Pantoea*, *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*,

*Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Erwinia* (Patiño, 2010.), siendo los tres primeros, los géneros con mayor potencial de solubilización de fosfato y de estos, *Pseudomonas* es, según varias fuentes e investigaciones, el género con mayor capacidad solubilizadora de fosfato ya que produce gran variedad de ácidos orgánicos y presenta altos niveles de enzima fosfatasa (Vargas, 2012).

Además de los anteriores, se sabe que los actinomicetes también presentan esta propiedad. Gómez, *et al* (2011) realizaron un estudio para determinar la capacidad de estos organismos para mineralizar fósforo orgánico y su interacción rizosférica con micorrizas en *Trifolium repens* L. (trébol blanco). Del estudio se obtuvo que la inoculación de sólo actinomicetes presentó valores mayores de fósforo inorgánico en el suelo, mientras que la concentración de fósforo a nivel foliar fue mayor cuando había co-inoculación del actinomicete con las micorrizas.

Es importante recalcar, que la cantidad de fósforo solubilizado va a ser altamente dependiente de la fuente de P que se tenga y del tipo de microorganismo que se encargue del proceso, sea hongo, bacteria o actinomicete (Richardson, *et al.* 2009).

Por otro lado, al estar tratando con organismos vivos se deben de tomar en cuenta ciertas consideraciones ya sea en laboratorio, invernadero o campo para que los mismos puedan sobrevivir y cumplir con las funciones para las cuales se realizan las inoculaciones. Por ejemplo, al momento de realizar las inoculaciones en campo, se sabe que la densidad de población de estos organismos solubilizadores de P declina, pero su supervivencia va a depender de la composición del suelo, pH, temperatura y factores bióticos tales como la competencia con otros microorganismos, predación y el crecimiento de las raíces; estos afectarán directamente la capacidad de multiplicación de estos organismos y por lo tanto su eficacia (Khan, *et al.* 2007).

Asimismo, estos organismos se ven desfavorecidos al actuar bajo condiciones alcalinas (pH mayores a 7) y la capacidad tampón (capacidad de mantener el pH estable con la adición de pequeñas cantidades de bases o ácidos fuertes) que ostente el suelo también influirá en su eficiencia. Lo anterior junto con el tipo de cepa que se utilice y el genotipo de las plantas a las que se apliquen estos microorganismos, harán que se obtenga ya sea una respuesta favorable o desfavorable para estas aplicaciones (Khan, *et al.* 2007).

Si bien es cierto que la solubilización de P mediada por los microorganismos y la mineralización del P orgánico son procesos importantes mediante el cual los microorganismos son capaces de adquirir P del suelo; algunos autores sostienen que es poco probable que los microorganismos logren solubilizar suficiente P para cumplir las demandas de la planta, ya que éstas están por encima de las propias necesidades de los microorganismos (Tinker, 1980).

## **VII. Enzimas involucradas en el proceso de solubilización de P**

De los compuestos orgánicos que se encuentran en el suelo, se da la liberación de P orgánico por medio de tres grupos de enzimas: a) las fosfatasas, b) las fitasas y c) las fosfonatasas y liasas C-P, de las cuales, las dos primeras presentan mayor actividad. En el caso del P inorgánico, el efecto de los ácidos orgánicos es fundamental; en este caso, el ácido orgánico producido por el microorganismo va a depender de la fuente de carbono disponible en el suelo (Patiño, 2010.).

La actividad enzimática es específica de cada suelo, ya que esta depende de la cantidad de materia orgánica, biomasa microbiana, características fisicoquímicas y prácticas de manejo que se dé en cada uno (Valenciano, 2014).

La gran mayoría de enzimas son producidas por los microorganismos que habitan el suelo, no obstante, algunas de ellas se generan también por medio de secreciones de la rizósfera y lisis celular (Cerón y Megarejo, 2005).

Los microorganismos producen estas enzimas con el fin de obtener los nutrientes que necesitan para su desarrollo, ya que con ellas pueden degradar y solubilizar sustratos orgánicos del suelo, además de jugar un papel fundamental en la descomposición de materia orgánica y en la mineralización de nutrientes (Harris, 1992).

En el caso de la mineralización del P en el suelo, las fosfatasas son las enzimas que presentan mayor actividad. Estas hidrolizan enlaces de pirofosfatos, metafosfatos y polifosfatos inorgánicos (Malcolm, 1983). Se clasifican en cinco grupos: hidrolasas de monoésteres fosfóricos, hidrolasas de diésteres fosfóricos, hidrolasas de monoésteres trifosfóricos, enzimas que actúan sobre anhídridos que contienen fósforo y enzimas que actúan sobre enlaces P-N (Valenciano, 2014). Las fosfatasas se pueden encontrar en su

forma tanto ácida como alcalina; esto depende del rango de pH en el cual las mismas están activas (pH 4-6 se encuentra activa la fosfatasa ácida; pH 9-11 se encuentra activa la fosfatasa alcalina), razón por la cual, son especialmente sensibles a los cambios de pH en el suelo (Eivazi y Tabatabai, 1977).

En los suelos cuyo uso principal es la agricultura, se presenta una relación fuerte entre la dinámica microbiana y la actividad de las enzimas, ya que estas mejoran la disponibilidad de nutrientes para satisfacer las necesidades metabólicas de los microorganismos (Sinsabaugh, *et al.* 2008).

Estas enzimas son las encargadas de producir un equilibrio entre las cantidades disponibles en la solución del suelo y las cantidades totales de fósforo en el suelo; ejemplo de lo anterior son los fosfatos de inositol, los cuales son la principal forma de P orgánico en el suelo y cuya solubilización depende de la actividad de las enzimas como la fitasa (Fallas, 2013; Paul y Clark, 1996).

## **VIII. Asociaciones entre microorganismos solubilizadores de P y fijadores de N**

Los microorganismos solubilizadores de fósforo se han estudiado de manera individual pero también se han estudiado las asociaciones entre estos microorganismos con microorganismos fijadores de nitrógeno.

Khan, *et al* (2007) indican que estos microorganismos no son antagónicos entre si y por el contrario, la inoculación de ambos genera resultados más favorables que la inoculación de cada uno de estos organismos por separado; ya que aquellos con potencial de solubilización de P, pueden aumentar la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno y de elementos traza como hierro, zinc, etc., incrementando, por lo tanto, el crecimiento de la planta.

Esta idea la refuerza Alarcón y Ferrera (2000), ya que mencionan que los microorganismos fijadores de N requieren de grandes cantidades de energía que se suple por medio de la fotosíntesis, que es un proceso dependiente del suministro de P a la planta, razón por la cual se esperaría que ambos tipos de microorganismos funcionen mejor en conjunto. No obstante, los microorganismos fijadores de nitrógeno presentan la limitante de

tener una alta especificidad, lo cual define el éxito del establecimiento y funcionalidad del microorganismo en el campo (Alarcón y Ferrera, 2000).

Tanto los microorganismos solubilizadores de P como los fijadores de N pueden inducir cambios fisiológicos en las plantas, como la síntesis de reguladores de crecimiento, que estimulan la tasa de crecimiento de las plantas (Alarcón y Ferrera, 2000)

López, *et al.* (2008) evaluaron el efecto de *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* (bacteria solubilizadora de fósforo) y *Azotobacter* sp. (bacteria fijadora de nitrógeno) en un suelo de alta fertilidad y un suelo de baja fertilidad, utilizando fertilización inorgánica y fertilización biológica por medio de estas bacterias. En este estudio se obtuvo, entre otras cosas, que la bacteria solubilizadora de P tuvo un efecto más marcado en el suelo de baja fertilidad que en el de alta fertilidad y que la cepa fijadora de nitrógeno, logró un mejor comportamiento en los suelos con mayor disponibilidad de P, lo cual concuerda con lo mencionado por Khan, *et al* (2007).

Sin embargo, esta respuesta de la bacteria bajo condiciones deficientes de P en el suelo, no es una condición que se presente en todos los casos, ya que Tejera, *et al* (2013) menciona que algunos los microorganismos solubilizadores de P exhiben represión de la actividad solubilizadora en presencia de P soluble en el suelo, mientras que otros no.

## **IX. Uso de microorganismos solubilizadores de P en otros países**

Existe evidencia del uso exitoso de estos microorganismos como alternativas eficientes para la fertilización de los cultivos. En el caso de Colombia se ha utilizado *Penicillium janthinellum* en el cultivo de arroz, *Pseudomonas fluorescens* en Cuba para el cultivo de tomate, *Penicillium bilaiae* en Canadá para el cultivo de trigo y *Penicillium bilaiae* además de *Penicillium radicum* en el caso de Australia (Patiño, 2010).

Por otro lado, en Rusia se han venido utilizando desde hace varios años, bacterias y hongos solubilizadores de fósforo como una práctica agrícola común que ha dado buenos resultados y se ha demostrado que la combinación de distintas cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento produce un efecto benéfico en arroz y en cebada (INIFAP, 2012).

No obstante a lo anterior, otros autores como Núñez y Acevedo (2005) mencionan que no obtuvieron una respuesta positiva con la inoculación de microorganismos en el cultivo de papa. En este ensayo, los autores realizaron evaluaciones de fertilización con fósforo junto con el biofertilizante Fosfosol®, el cual tiene como ingrediente activo a *Penicillium janthinellum* Biourge. En el mismo no se mostraron diferencias en las concentraciones de P en tejido foliar y rendimiento del tubérculo.

El proceso de solubilización del fosfato por parte de los microorganismos, no solamente compensa los altos costos de fabricación de fertilizantes, sino que también moviliza el fósforo adicionado al suelo por medio de los fertilizantes sintéticos (Bobadilla y Rincón, 2008). Este punto es de gran importancia debido a que para elevar el contenido de P en la solución del suelo 1mg/Kg, se requiere aplicar de 60 a 200mg/Kg de este elemento (López, *et al.* 2008).

Debido a esta razón, en varios países se ha venido impulsando el uso cada vez mayor de biofertilizantes en complemento o en sustitución de los fertilizantes sintéticos. Colombia, por ejemplo, tiene registrados en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 110 productos de este tipo, que a su vez 93 empresas fabrican, exportan y comercializan (Campo, 2010).

## METODOLOGÍA

### Localización.

El suelo necesario para el estudio fue tomado en la localidad de Rancho Redondo (Lat. 9,574112°; Log -83,57022°), en un suelo Andisol con alta fijación de P (Fallas, 2013; Mata, *et al.* 2013). En esta localidad se tomaron muestras de mantillo de una zona boscosa con el fin de conformar una muestra compuesta para aislar los microorganismos y se recolectó suelo de pastizal para utilizar en el ensayo en invernadero.

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Universidad de Costa Rica (UCR), donde se realizaron los aislamientos de aquellos microorganismos que se lograron identificar como solubilizadores de fósforo.

Por último, se realizó un ensayo en el invernadero del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), utilizando la bacteria, el hongo y la levadura que resultaron más eficaces en la solubilización de fósforo (P) en las pruebas *in vitro*. Estos microorganismos se evaluaron en plantas de arroz, junto con una cepa de *Azospirillum oryzae* utilizada como posible fuente de Nitrógeno.

### Aislamiento de microorganismos.

Para conformar una muestra compuesta se recolectaron 10 muestras de manera aleatoria en un área total de 1000 m<sup>2</sup> de la zona boscosa elegida, para ello se eliminó la hojarasca superficial y se recolectaron los primeros cinco centímetros de mantillo. La muestra se llevó al laboratorio de Microbiología Agrícola de la Universidad de Costa Rica para proceder al aislamiento de los microorganismos solubilizadores de fósforo.

Para ello se incubaron 500 mL del mantillo de bosque con 250 mL de semolina y 50 mL de melaza con el objetivo de incrementar las poblaciones de microorganismos solubilizadores de fósforo (Castro, 2015). Esta mezcla se uniformó, manteniendo un nivel de humedad adecuado y se dividió en 2 botellas de 1 L de capacidad cada una. Ambos

frascos se cerraron herméticamente pero manteniendo una salida para el gas producido por los microorganismos (Figura 1). Estas botellas se dejaron reposando en oscuridad por un período de un mes.

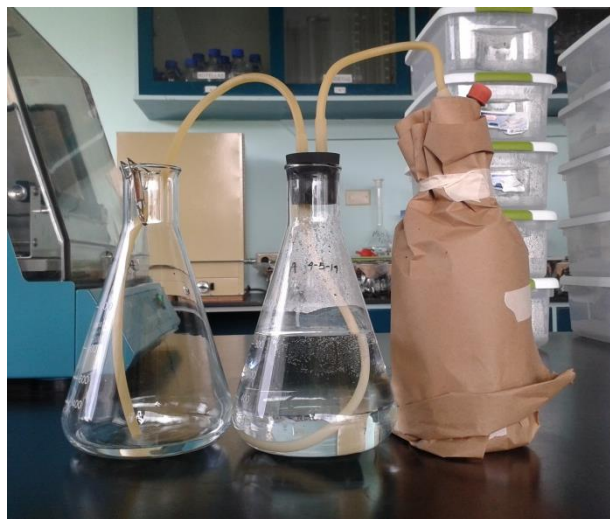


Figura 1. Incubación del mantillo de bosque. San Pedro, San José. 2015.

Después del período de incubación, se tomaron 20 g del contenido de cada una de las botellas y se mezclaron con 500 mL de agua sin cloro y 18,4 mL de melaza y se dejaron en oscuridad durante 12 días para promover la multiplicación de los microorganismos.

Luego de lo anterior, se procedió al aislamiento de los microorganismos con capacidad solubilizadora de fósforo utilizando el medio de cultivo de Osorio y Habte (2001) (Anexo 1) al cual se le adicionó roca fosfórica con un tamaño de partícula entre 90 y 500 $\mu$ m, y utilizando la metodología de diluciones seriadas. Para las diluciones se midieron 10mL de la mezcla preparada anteriormente, los cuales se colocaron en botellas con 90 mL de agua previamente auto clavada y se pusieron en agitación durante 30 min. Seguidamente se tomó de cada una de las botellas 1 mL y se colocó en tubos de ensayo con 9 mL de agua estéril (dilución  $10^{-2}$ ). De este tubo, se tomó 1 mL y se pasó a otro tubo con 9 mL (dilución  $10^{-3}$ ). Lo anterior se repitió hasta alcanzar la dilución  $10^{-7}$  (Figura 2).



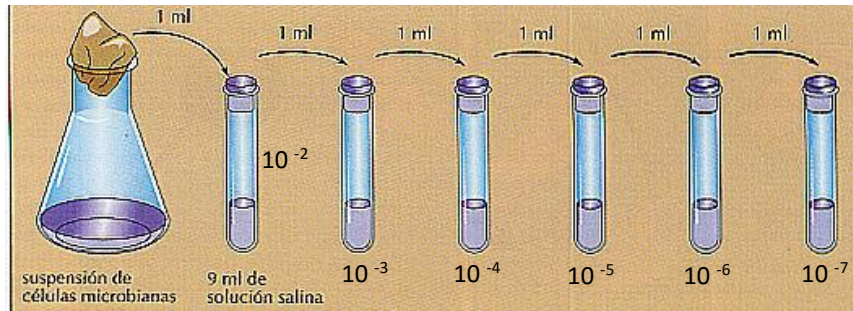


Figura 2. Dilución seriada para el aislamiento de microorganismos. San Pedro, San José. 2015.

A partir del tubo correspondiente a la dilución  $10^{-3}$  y hasta  $10^{-7}$  se tomaron  $100 \mu\text{L}$  y se colocaron en platos con el medio de cultivo de solubilizadores de fósforo. El caldo microbiano se esparció en el plato con un asa Digralesky y los platos se dejaron incubando a  $25^{\circ}\text{C}$ . A partir del día dos, se procedió a re aislar todas aquellas colonias que mostraran habilidad para solubilizar P (Figura 3). Lo anterior se logró por medio de la producción de un halo amarillo en el caso de los microorganismos capaces de solubilizar este elemento y los cuales generan disminución en el pH del medio que se ve reflejado con la transición de color azul a color amarillo del medio (Figura 3B).

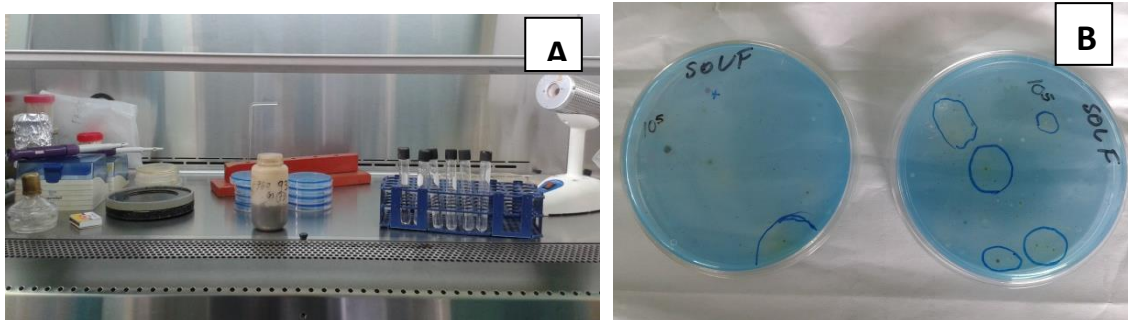


Figura 3. A) Material utilizado para realizar las diluciones. B) Selección de los microorganismos obtenidos con las diluciones seriadas, que presentaron capacidad de solubilizar fósforo. San Pedro, San José. 2015.

Seguidamente se realizaron los aislamientos necesarios para obtener colonias de microorganismos puros y al mismo tiempo monitorear que conservaran su habilidad solubilizadora. Esto por medio del pasaje continuo de los microorganismos al medio de

Osorio y Habte (2001) con el fin de observar si producían cambio de color en el medio, lo cual significaba que aún tenían capacidad de solubilizar el nutrimento.

### **Pruebas de solubilización de fósforo in vitro.**

Para realizar estas pruebas, se utilizaron platos con medio de solubilizadores de fósforo, en el caso de los hongos. Estos se dividieron en 4 partes iguales (Figura 4) y en el centro se retiró una porción circular de medio con una pipeta Pasteur, usada como sacabocados, para colocar ahí una porción circular de igual tamaño, del medio con el hongo de interés. Para cada hongo se midió durante una semana, la formación de halo y el viraje a color amarillo del medio.

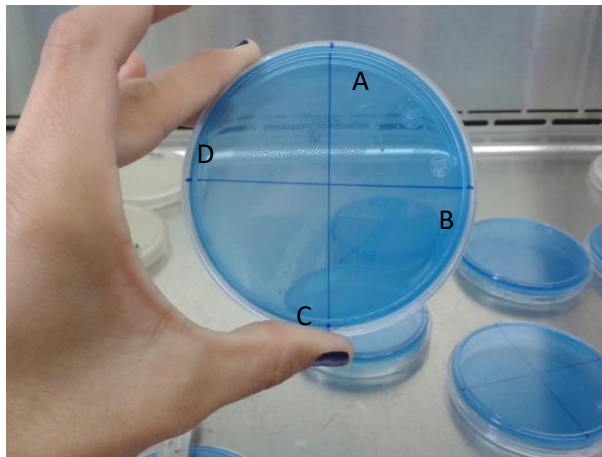


Figura 4. Platos utilizados en las pruebas in vitro para medir la capacidad solubilizadora de P de los hongos. San Pedro, San José. 2015.

Se realizaron 4 repeticiones (4 platos) por microorganismo y una vez colocado el hongo, los platos se dejaron en la incubadora a 25°C. A los 3 y 5 días después de haber colocado el inóculo en el plato (Figura 5), se realizaron mediciones del halo de solubilización en los puntos: A, B, C y D de cada plato (Figura 4).

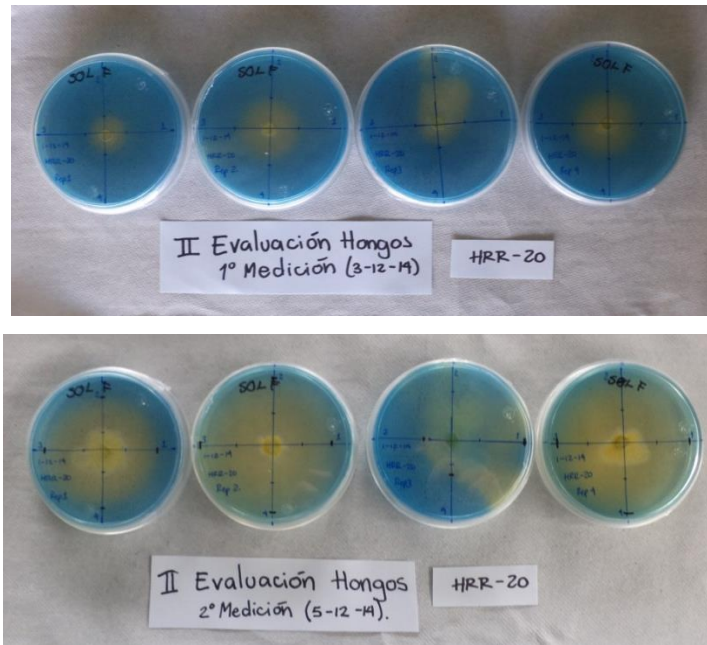


Figura 5. Evaluaciones in vitro de solubilización de fósforo de los hongos aislados del suelo andisol. San Pedro, San José. 2015.

En el caso de las bacterias y levaduras se utilizó el medio de Osorio y Habte (2001) modificada a medio líquido. Se utilizaron tubos de ensayo con 9mL de este medio y se realizaron 3 repeticiones por cada bacteria o levadura.

A cada tubo se le inocularon 100µL del caldo bacteriano correspondiente, y paralelamente se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-7}$  para saber la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) que se inocularon al medio (Cuadro 1).

Para la preparación del caldo bacteriano que sería inoculado a los tubos con medio, se utilizó una solución salina al 0,85%, en la cual se diluyeron las colonias previamente purificadas y crecidas de cada microorganismo, hasta alcanzar un nivel de turbidez de  $10^{-8}$  que se comparó con el estándar de turbidez McFarland.

Una vez alcanzado este nivel de turbidez, se tomaron 100µL para realizar las diluciones seriadas (utilizadas para conocer la concentración del inóculo), y 100µL para inocular cada una de las repeticiones.

En el caso de bacterias y levaduras se evaluó el pH del medio y cantidad de fósforo en solución, razón por la cual, en este caso se utilizó un testigo como referencia, al cual no se le realizó la inoculación de ningún microorganismo (Figura 6).

Cuadro 1. Concentración de los caldos microbianos con los cuales se inocularon las pruebas in vitro de bacterias y levaduras. San Pedro, San José 2015.

ID Micoorganismo	Recuento
LRR-8	$6,0 \times 10^{-7}$
LRR-9	$9,5 \times 10^{-6}$
LRR-22	$1,4 \times 10^{-7}$
LRR-11	$1,2 \times 10^{-7}$
LRR-51	$1,6 \times 10^{-8}$
LRR-21	$9,5 \times 10^{-7}$
BRR-18	$2,3 \times 10^{-9}$
BRR-19	$2,2 \times 10^{-9}$
BRR-52	$1,1 \times 10^{-9}$
BRR-55	$2,5 \times 10^{-9}$
BRR-50	$2,5 \times 10^{-9}$

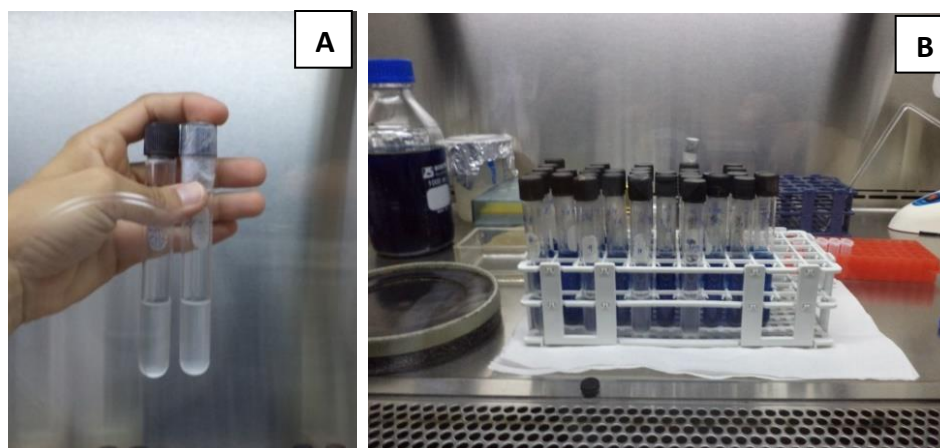


Figura 6. A) Caldo bacteriano a la izquierda comparado con un estándar McFarland a la derecha. B) Materiales para las inoculaciones y diluciones seriadas de bacterias y levaduras. San Pedro, San José 2015.

Una vez inoculados, los tubos se incubaron a 27°C y a 200rpm. Cumplida la semana, los caldos se filtraron utilizando papel filtro Fisherbrand P8 con retención de partículas mayores a los 20 µm (Figura 7). A cada una de las repeticiones se les midió el pH y posteriormente se llevaron al Laboratorio de Suelos y Foliare del CIA para que se les midiera la cantidad de P en solución por medio de Espectroscopia de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES).

Los datos obtenidos de las pruebas in vitro, tanto para bacterias y levaduras como para hongos, se analizaron por medio de un ANDEVA y como separador de medias se utilizó la prueba de Tukey al 5%.

Todas las cepas microbianas se almacenaron en refrigeración (-70°C) y se eligieron los microorganismos HRR-20 (hongo), LRR-9 (levadura) y BRR-19 (bacteria), para ser utilizados en el ensayo en invernadero. Estos microorganismos se enviaron al Laboratorio de Técnicas Moleculares del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC) para su identificación molecular.

Además de estos, se escogió la cepa de *Azospirillum oryzae* PC J1 CIA-UCR para ser utilizada en los ensayos de invernadero con el fin de evaluar la sinergia que se podría dar entre los microorganismos seleccionados y esta bacteria fijadora de nitrógeno.



Figura 7. Caldos bacterianos y de levaduras filtrados luego de 7 días de haber sido inoculados. San Pedro, San José. 2015.

## Ensayo en invernadero.

Para el ensayo en invernadero se realizó un almácigo de arroz Palmar 18, en bandeja de 200 celdas con una mezcla de 75% del suelo Andisol de Rancho Redondo (Anexo 2, 3 y 4) y 25% de peatmoss, con el fin de escoger plantas lo más homogéneas posibles. En el Cuadro 2 se presentan algunas características de este suelo en cuanto a las cantidades de P presentes.

Cuadro 2. Análisis químico del suelo de Rancho Redondo utilizado para el ensayo en invernadero. San Pedro, San José. 2015.

		ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS					
		pH H <sub>2</sub> O	P disponible mg/L	P total ppm	%		Relación C/N
ID USUARIO	ID LAB	C	N				
SUELO RANCHO REDONDO	S-14-07247	5,3	6	900	3,00	0,31	9,7

\*\*Fósforo disponible determinado mediante Olsen modificado y valorado por Colorimetría con el Analizador de Inyección de Flujo (FIA); Fósforo total determinado mediante digestión húmeda con HNO<sub>3</sub> y determinación por Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma (ICP); el % C y N totales se determinaron con el Autoanalizador de C/N por combustión seca.

En la bandeja de 200 celdas se colocaron 2 semillas por celda, y a los 13 días después de la siembra las plantas fueron trasplantadas a nuevas celdas de almácigo de 200cc de capacidad, las cuales contenían el suelo recolectado de Rancho Redondo (Cuadro 2). En estas celdas, se trasplantaron las dos plantas de arroz que contenía cada celda de la bandeja de 200 celdas, para luego ser raleadas a una planta por celda (de 200cc) (Figura 8).

El diseño experimental de este ensayo estuvo conformado con 9 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento. Cada repetición de los tratamientos contó con 12 plantas, divididas en dos recipientes con 6 plantas cada una como se observa en la Figura 8, B). Los dos recipientes por repetición conformaron la unidad experimental, y cada una de estas se utilizó para contener el agua de riego, con el fin de que el suelo se mantuviera a capacidad de campo en todo momento.



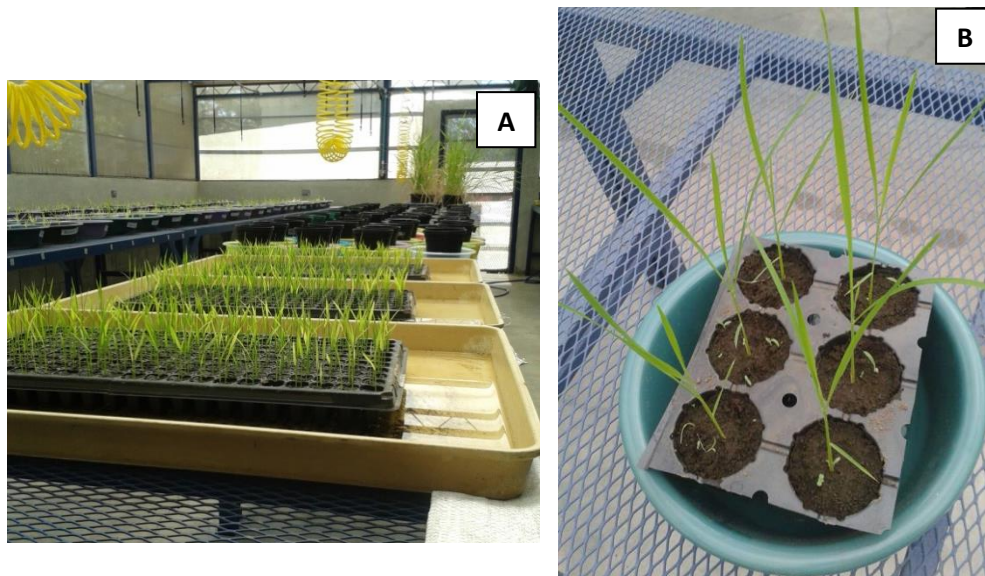


Figura 8. A) Siembra de almácigo de arroz Palmar 18 y B) su posterior trasplante a celdas de 200cc para conformar las repeticiones. San Pedro, San José. 2015.

En total se utilizaron 72 recipientes con 6 plantas cada una, que representaban las 36 repeticiones de los 9 tratamientos. A continuación se presentan los tratamientos que fueron evaluados:

- Testigo absoluto (T).
- Hongo solubilizador de fósforo (*Aspergillus flavus*), HRR-20 (H)
- Bacteria solubilizadora de fósforo (*Pseudomonas fragi*), BRR-19 (B)
- Levadura solubilizadora de fósforo (*Pichia anomala*), LRR-9 (L)
- Testigo *Azospirillum oryzae*, J1 (T:A)
- Hongo solubilizador de fósforo, HRR-20 + *Azospirillum oryzae*, J1 (H+A)
- Bacteria solubilizadora de fósforo, BRR-19 + *Azospirillum oryzae*, J1 (B+A)
- Levadura solubilizadora de fósforo, LRR-9 + *Azospirillum oryzae*, J1 (L+A)
- Hongo solubilizador de fósforo, HRR-20 + Bacteria solubilizadora de fósforo, BRR-19 + Levadura solubilizadora de fósforo, LRR-9 + *Azospirillum oryzae*, J1 (H+B+L+A).

Para el ordenamiento de los tratamientos se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar, con previa aleatorización de los tratamientos. Estos se colocaron en 2 mesas del invernadero con dos hileras en cada mesa (Figura 9).

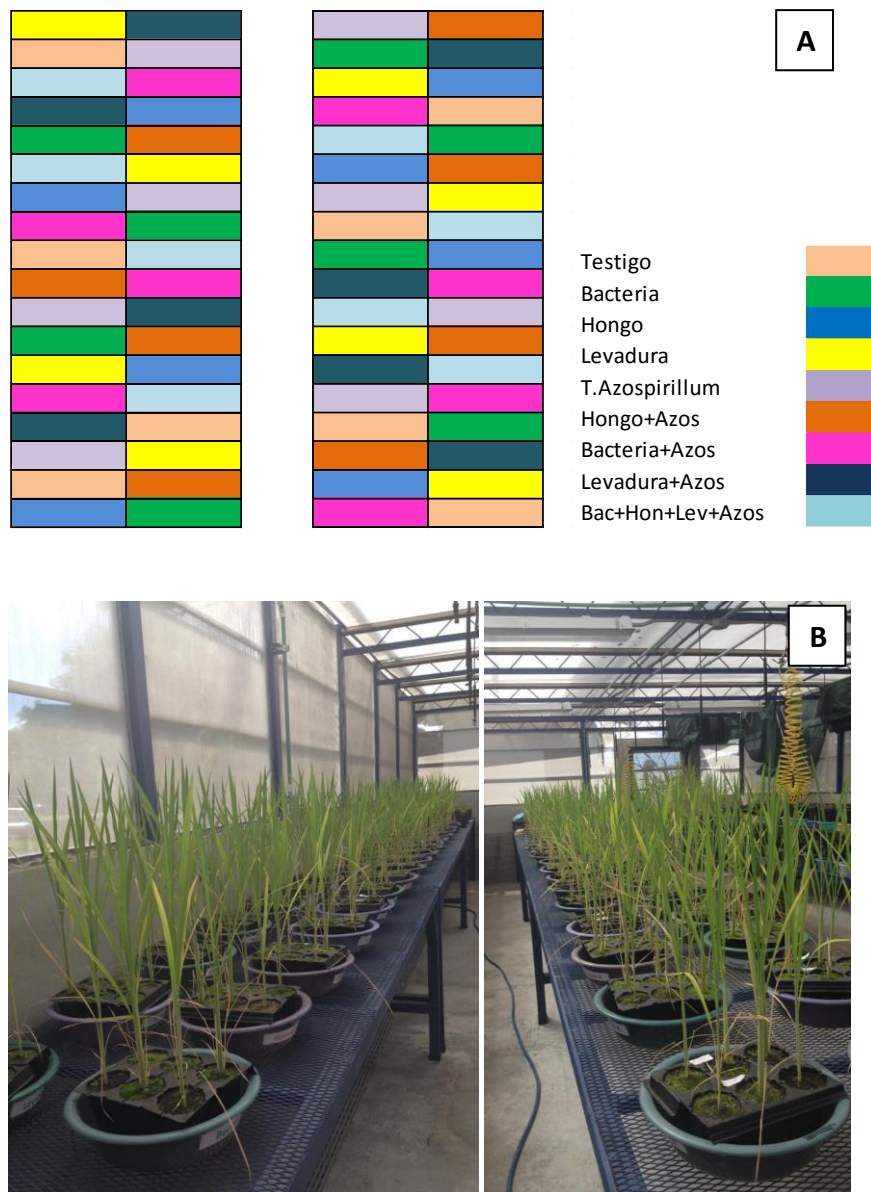


Figura 9. A) Diseño irrestricto al azar utilizado en el ensayo B) Ordenamiento de las unidades experimentales según los tratamientos utilizados en el ensayo en invernadero. San Pedro, San José. 2015.



Se realizaron las inoculaciones de los microorganismos un día después del trasplante (14 días después de la siembra), a los 22 (36dds) y 44 días (57dds) después del trasplante. Para la primera inoculación, se aplicaron 2mL del caldo de microorganismos (según el tratamiento) por planta, y para la segunda y tercera inoculación se aplicaron 5mL por cada planta.

Los microorganismos escogidos se cultivaron en medio de Agar nutritivo y Agar papa dextrosa una semana antes de que se realizara la inoculación, y el día de la aplicación se realizó una dilución seriada de cada uno de ellos para conocer la concentración en que fueron aplicados.

Para lo anterior se agregaron aproximadamente 4mL de agua estéril, la cual se agregó a los platos donde crecían los microorganismos y con un aplicador se suspendió todo el crecimiento de los mismos. El caldo resultante se pasó a botellas plásticas las cuales contenían agua estéril. De estas botellas se tomaron los volúmenes necesarios para hacer las mezclas de los microorganismos según los tratamientos. De cada suspensión se realizaron diluciones seriadas para conocer la concentración en que cada microorganismo fue aplicado en las tres ocasiones a las plantas de arroz (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentración de las suspensiones microbianas aplicadas a las plantas de arroz en las diferentes inoculaciones realizadas. San Pedro, San José. 2015.

<b>Microorganismo</b>	<b>1<sup>era</sup> inoculación 2ml</b>	<b>2<sup>da</sup> inoculación 5ml</b>	<b>3<sup>era</sup> inoculación 5ml</b>
J1 ( <i>Azospirillum oryzae</i> )	1,2x10 <sup>9</sup>	1,7x10 <sup>9</sup>	5,5x10 <sup>8</sup>
BRR-19 ( <i>Pseudomonas fragi</i> )	4,2x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>9</sup>	1,1x10 <sup>9</sup>
LRR-9 ( <i>Wikerhamomyces anomalus</i> )	9x10 <sup>7</sup>	9x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>8</sup>
HRR-20 ( <i>Aspergillus flavus</i> )	5x10 <sup>7</sup>	2x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>8</sup>

### Toma de datos.

A los 102 días después de la siembra se realizó la cosecha de la plantas, y se realizaron las evaluaciones correspondientes. En primer lugar se realizó la cosecha de la parte aérea, cortando las plantas con tijeras a ras del suelo (Figura 10). Cada planta se pesó inmediatamente después de ser cortada y seguidamente fue medida utilizando una cinta métrica (Figura 11), luego se colocaron individualmente en bolsas de papel y se pusieron a secar durante 1 día a una temperatura de 80°C.

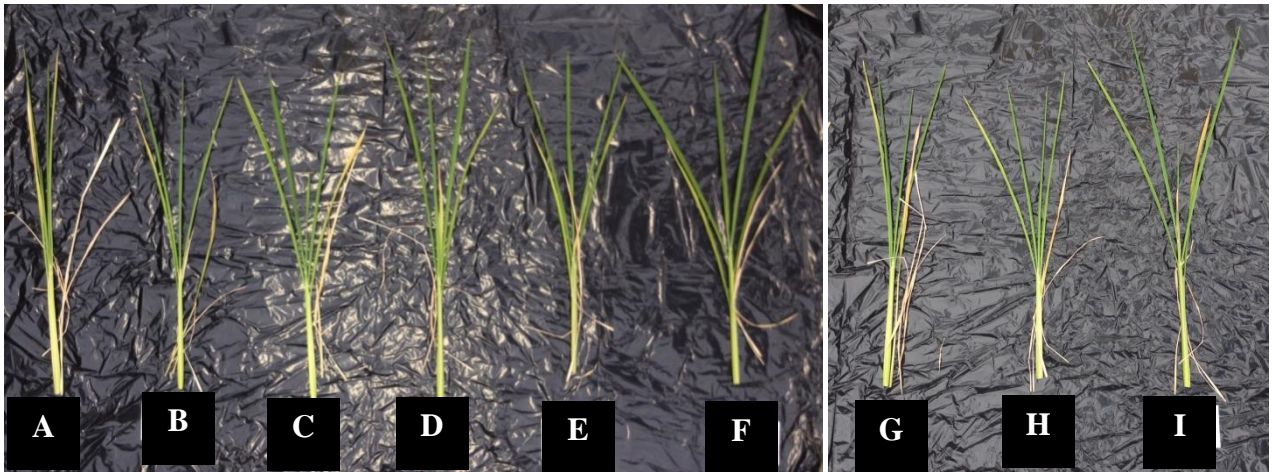


Figura 10. Parte aérea de plantas de arroz correspondientes a los diferentes tratamientos del ensayo: A) Testigo, B) Bacteria, C) Hongo, D) Levadura, E) Testigo de *Azospirillum oryzae*, F) Bacteria+Hongo+Levadura+*Azospirillum oryzae*, G) Levadura+*Azospirillum oryzae*, H) Bacteria+*Azospirillum oryzae*, I) Hongo+*Azospirillum oryzae* San Pedro, San José. 2015.



Figura 11. Medición y pesaje de parte aérea de plantas de arroz correspondientes a los diferentes tratamientos del ensayo. San Pedro, San José. 2015.

Al día siguiente, se cosecharon las raíces, las cuales fueron lavadas cuidadosamente para evitar la pérdida de material y de igual manera, pesar una vez que estuvieran secas (Figura 12). Luego, cada raíz se midió utilizando la raíz principal como referencia. Posterior a esto, se guardaron individualmente en bolsas de papel para ser secadas al igual que la parte foliar.

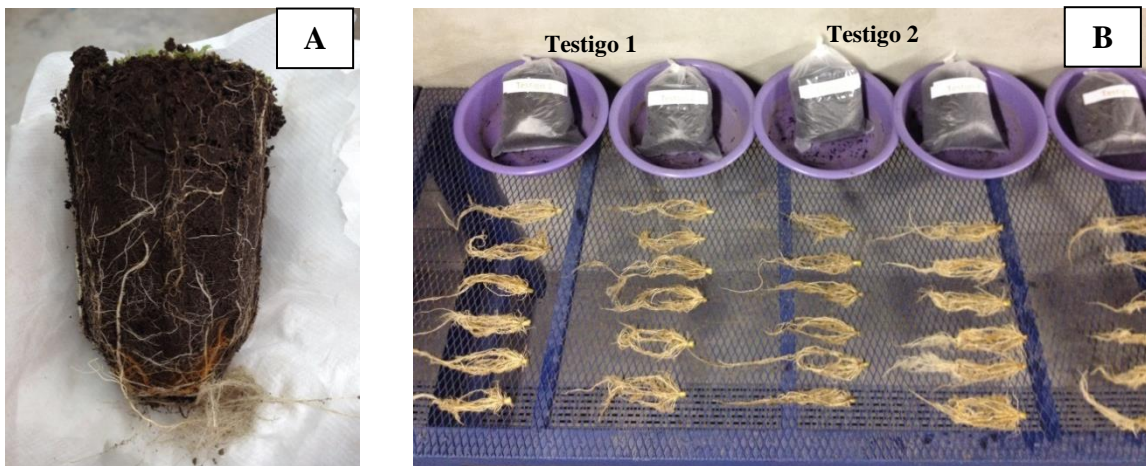


Figura 12. A) Raíces de plantas de arroz una vez cosechada la parte aérea. B) Raíces de plantas de arroz correspondientes al tratamiento testigo una vez lavadas y secas. San Pedro, San José. 2015.

Luego de tener parte aérea y raíces secas, éstas se pesaron de nuevo de manera individual. Finalmente se unieron las 12 plantas por repetición para enviar las muestras al Laboratorio de Suelos y Foliar del CIA y realizarles un análisis químico foliar por cada repetición.

### **Sobrevivencia de Microorganismos y determinación del P soluble en el Suelo.**

Para la determinación de P en solución y sobrevivencia de microorganismos después del ensayo; se tomó una muestra del suelo de cada una de las repeticiones de los tratamientos correspondientes al Testigo (T), *Aspergillus flavus* HRR-20 (H), *Pseudomonas fragi* BRR-19 (B), *Pichia anomala* LRR-9 (L) y Testigo *Azospirillum oryzae*, PC J1 CIA-UCR (T.A), 3 meses después de la cosecha.

Estas muestras se llevaron al Laboratorio de Suelos y Foliar del CIA para determinar la cantidad de P en solución por medio de Espectroscopia de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES), al mismo tiempo que se llevaron al Laboratorio de Microbiología Agrícola del CIA, para realizar las diluciones seriadas con el fin de obtener la población de los microorganismos solubilizadores de P correspondientes en cada suelo, utilizando el método del número más probable.

Para las diluciones se pesaron 10g de suelo de cada repetición y se colocaron en botellas con 90mL de agua previamente autoclavada y se pusieron en agitación durante 30min.

Seguidamente se tomó de cada una de las botellas 1mL y se colocó en tubos de ensayo con 9mL de agua estéril (dilución  $10^{-2}$ ), de la misma manera que se realizó para el aislamiento de microorganismos para las pruebas in vitro; lo anterior se repitió hasta alcanzar la dilución  $10^{-5}$ .

Se utilizaron platos con medio de solubilizadores de P (Osorio y Habte. 2001), divididos en tres partes y a partir del tubo correspondiente a la dilución  $10^{-2}$  y hasta  $10^{-5}$  se colocaron 10  $\mu$ L en cada uno de los 3 puntos en cada plato (correspondientes en este caso a los platos de las diluciones de  $10^{-3}$  y hasta  $10^{-6}$ ).

Los platos se dejaron incubando a 25°C y se realizaron observaciones a los 4 y 6 días de incubación (Figura 13). Al sexto día, se utilizó una Tabla del número más probable para determinar la cantidad de microorganismos viables, capaces de solubilizar fósforo.

Una vez realizada la toma de datos de todas las variables evaluadas, se procedió a realizar el análisis estadístico de los datos por medio del análisis ANDEVA de Infostat. Para la separación de medias, se utilizó una prueba de Tukey al 5% en el caso de las variables para parte aérea y raíz, UFC y P en solución. Para la separación de medias del análisis químico foliar, se utilizó la misma prueba de Tukey al 10%.

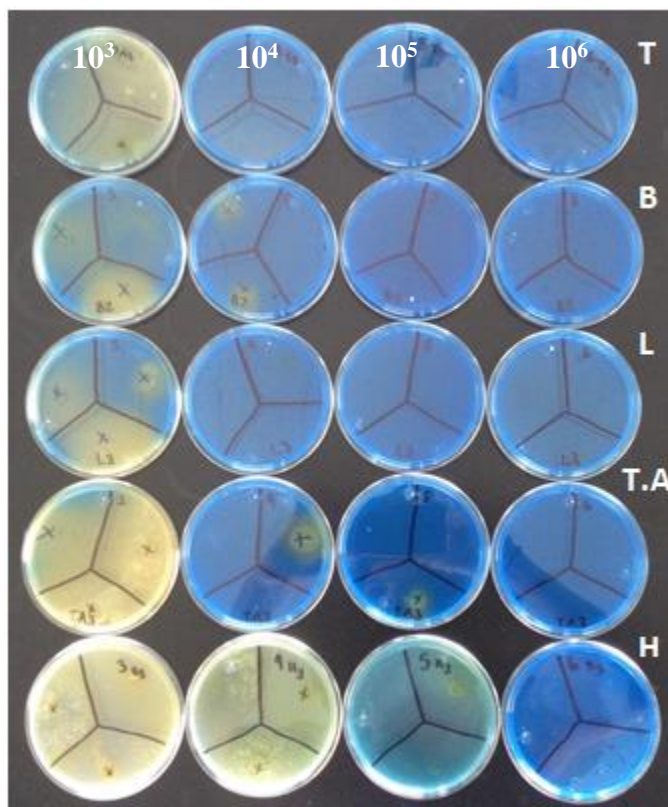


Figura 13. Platos con medio de solubilizadores de P, correspondientes a la determinación del Numero más probable (NMP) en los tratamientos Testigo (T), Bacteria (B), Levadura (L), Testigo de Azospirillum sp. J1 (T.A) y Hongo (H) utilizados en el ensayo en invernadero. San Pedro, San José. 2015.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento de microorganismos.

Del suelo elegido, se lograron seleccionar 54 microorganismos con capacidad de solubilizar fósforo (P) en condiciones *in vitro*. Esta capacidad se evidenció mediante el cambio de color del medio, de azul a amarillo, como consecuencia de un cambio en el pH (Figura 14). El medio utilizado (Osorio y Habte, 2001), contiene verde de bromocresol como indicador de pH; es color azul a pH mayor a 5,4 y empieza a cambiar a amarillo por debajo de este valor.

Los microorganismos solubilizadores de fósforo ponen a disposición el P que se tenía como no disponible, por medio de la producción de ácidos orgánicos, como consecuencia de su metabolismo para el consumo de glucosa (Hwangbo, *et al.* 2003); la producción de compuestos fenólicos, protones liberados durante la respiración o la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  y sideróforos; factores que provocan la disminución en el pH del medio, y la consecuente liberación del elemento (Awasthi, *et al.* 2011; Rashid, *et al.* 2004). Estos ácidos orgánicos pueden formar complejos solubles con iones metálicos asociados al P insoluble (Ca, Fe y Al) (Kepert, *et al.* 1979; Omar, 1998; Rashid, *et al.* 2004).

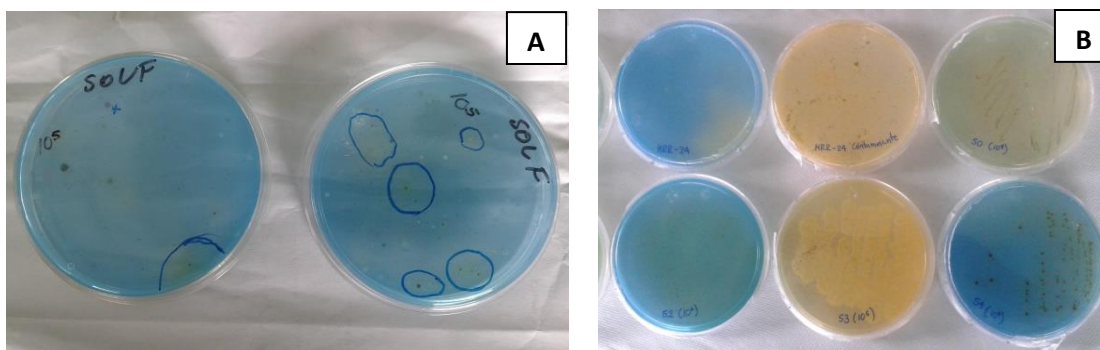


Figura 14. Microorganismos aislados del suelo Andisol elegido. A) Selección de microorganismos por medio de la aparición de halo color amarillo. B) Re aislamiento y purificación de los microorganismos con esta capacidad. San Pedro, San José, 2015.

Bernal (2010), utilizó el mismo medio de Osorio y Habte para la selección de microorganismos solubilizadores de P en raíces de plantas de vainilla. Al final de un período de incubación, el autor propone que aquellas colonias que exhibían un cambio de color a su alrededor (paso de color azul a color amarillo), lo hacían debido a la capacidad de estos organismos de solubilizar la roca fosfórica por medio de la producción de acidez.

De los 54 microorganismos identificados inicialmente, la cantidad se redujo posteriormente a 29 organismos (Cuadro 4). Lo anterior debido a que algunos de ellos perdían su capacidad de solubilizar P con los pasajes sucesivos y el almacenamiento en condiciones de refrigeración (Figura 14B).

Sperber (1958) encontró que, al igual que en el caso de este ensayo, muchas de las bacterias solubilizadoras de fosfatos, perdían esta capacidad con el subcultivo en serie; no obstante, Kucey (1983) menciona que los hongos solubilizadores de P preservan mejor su actividad después del subcultivo y ésta actividad se puede mantener durante algunos años.

### **Pruebas de solubilización de P in vitro.**

En el cuadro 4 se observan los microorganismos aislados del suelo de Rancho Redondo con capacidad de solubilizar fosfatos. Fueron utilizados 15 hongos, 9 levaduras y 5 bacterias para las pruebas in vitro y de estos, fueron seleccionados tres microorganismos (HRR-20, BRR-19 y LRR-9) para realizar el ensayo en invernadero.

En el caso de los hongos, se dio un crecimiento paulatino del halo de solubilización entre la primera y segunda evaluación en casi la totalidad de los microorganismos evaluados, no obstante el hongo HRR-29 por ejemplo, presentó en dos repeticiones un crecimiento acelerado del halo, ya que en la primera evaluación no generó un cambio en el color del medio y para la segunda evaluación el crecimiento del halo igualó las otras dos repeticiones para este organismo. Este hongo fue el que presentó mayores diferencias entre la primera y segunda evaluación del halo de solubilización debido al tipo de crecimiento que presentó.

Por el contrario, el hongo HRR-14 presentó la menor diferencia entre la primera y la segunda evaluación del halo y en el caso del hongo HRR-52, no se dio viraje en el color del

medio en ninguna de las evaluaciones, a pesar de que se dio el crecimiento normal del mismo.

Cuadro 4. Microorganismos aislados de un suelo Andisol con capacidad solubilizadora de fósforo (P). San Pedro, San José. 2015.

Lista de Microorganismos Seleccionados		
ID Hongos	ID Levaduras	ID Bacterias
HRR-13	LRR-8 *	BRR-18 *
HRR-14 *	LRR-9 **	BRR-19 **
HRR-18 *	LRR-11 *	BRR-50 *
HRR-19 *	LRR-17	BRR-52 *
HRR-20 **	LRR-21 *	BRR-55 *
HRR-21	LRR-22 *	
HRR-22	LRR-51 *	
HRR-24	LRR-53	
HRR-25	LRR-54	
HRR-26		
HRR-27 *		
HRR-29 *		
HRR-31 *		
HRR-51 *		
HRR-52 *		

\*Seleccionados para pruebas *in vitro*.

\*\* Seleccionados para pruebas *in vitro* y para ser utilizados posteriormente en ensayo de invernadero.

En la Figura 15 se muestra el halo de solubilización del hongo HRR-20 a los 3 días (Figura 15, A) y a los 5 días (Figura 15, B) después de las inoculaciones. Este presentó el mayor halo de solubilización con 32,44mm de radio para el halo de solubilización, seguido del HRR-29 con 32,08mm de radio. Este viraje en el medio se atribuye a la acidificación del medio (Bernal, 2010) como se mencionó anteriormente.

En el caso de los hongos, el ácido cítrico, oxálico, málico y glucónico, son algunos de los ácidos producidos más frecuentemente para la solubilización de aquellos complejos



insolubles con el fósforo (Alam, *et al.* 2002; Chun-Chao, *et al.* 2007; Dighton, 2007; Gómez-Guiñán y Zabala, 2001; Prahm y Sukla, 2005).

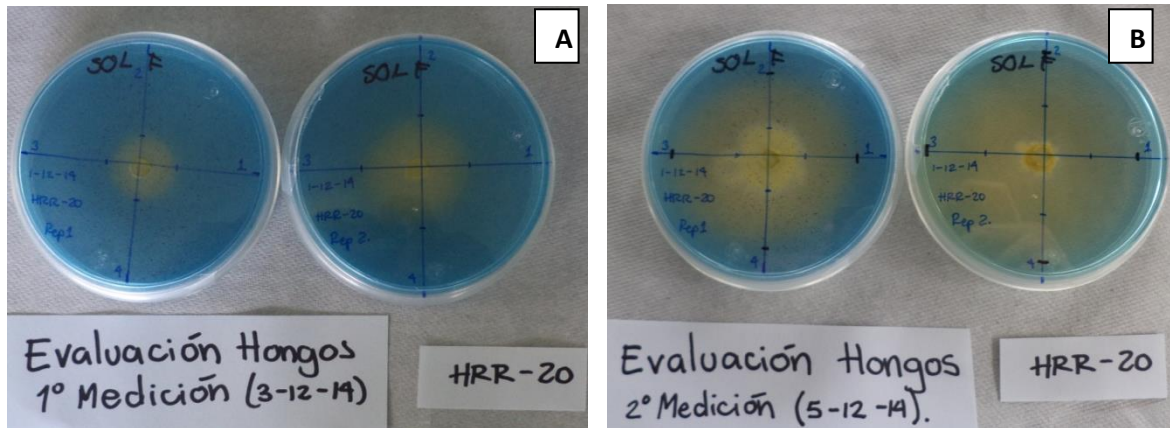


Figura 15. Pruebas de solubilización de P en hongos, a los 3 y 5 días después de la inoculación. A) HRR-20, repetición 1 y 2 a los 3 días de la inoculación, B) HRR-20, repetición 1 y 2 a los 5 días de la inoculación. San Pedro, San José. 2015.

De acuerdo a lo anterior, Kim *et al.*, (1997) encontraron que la producción de acidez fue el principal mecanismo en la solubilización de la roca fosfórica (hidroxiapatita) por *Enterobacter agglomerans* bajo condiciones *in vitro*.

Cordero, *et al.* (2008) registra crecimientos en el halo de solubilización en el caso de *Pantoea* sp. de 6mm en medio sólido NBRI-P, en 7 días a 30°C, utilizando como fuente insoluble de P en el medio, el fosfato tricálcico. Además, Nautiyal (1999) también reporta crecimiento en el halo de solubilización para cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* de 2 a 8 mm en el medio de cultivo durante 14 días.

Hernández *et al.* (2011), realizó pruebas de solubilización *in vitro* con *Paecilomyces lilacinus* utilizando fuentes de fosfato de calcio y fosfatos de hierro en medio Pikovskaya-agar modificado. En estas encontró que no se dieron diferencias significativas entre estas dos fuentes de fósforo; y en medio sólido, el mayor halo de solubilización se presentó a los 10 días después de la inoculación en el medio con fosfatos de calcio, donde el radio de solubilización alcanzó los 29,5mm.

Nahas (2007), menciona que la producción de las sustancias implicadas en la solubilización de P, requieren la absorción de nutrientes por parte de los microorganismos, sobre todo de carbono. Razón por la cual, la fuente de C, N y P que se utilicen en el medio de cultivo influyen notablemente sobre la solubilización y el crecimiento de los hongos.

En el presente ensayo los valores máximos en el radio de solubilización, sobrepasaron a los anteriormente mencionados y reportados en literatura, ya que alcanzan valores de 32,44mm para el radio de halo de solubilización correspondiente al hongo HRR-20, lo cual, según lo reportado por otros autores representa un halo bastante amplio. Por otro lado, en el caso del hongo HRR-52, no se produjo radio de solubilización debido a que no se dio viraje en el color del medio (radio de solubilización de 0mm) a pesar de que el microorganismo creció normalmente (Cuadro 5). Se podría asumir que para el hongo HRR-52, no se dio viraje en el medio de cultivo debido a que el organismo no produjo ácidos orgánicos con capacidad para solubilizar el P presente en el medio (Cordero, *et al.* 2008), contrario al hongo HRR-20, el cual tuvo el mayor crecimiento del halo de solubilización, de todos los hongos probados in vitro.

Cuadro 5. Crecimiento de halo de solubilización de hongos en prueba in vitro. San Pedro, San José. 2015.

<b>ID Hongo</b>	<b>1° evaluación 3er día Radio (mm)</b>	<b>2° evaluación 5to día Radio (mm)</b>	<b>Diferencia (5to día - 3er día) (mm)</b>
<b>HRR-29</b>	9,63	32,08	20,00
<b>HRR-31</b>	15,69	31,81	16,13
<b>HRR-14</b>	14,56	21,25	6,69
<b>HRR-51</b>	18,50	29,88	11,38
<b>HRR-27</b>	8,38	30,13	21,75
<b>HRR-18</b>	8,44	28,81	20,38
<b>HRR-19</b>	9,56	26,19	16,63
<b>HRR-52</b>	0,00	0,00	0,00
<b>HRR-20</b>	16,19	32,44	16,25

Gupta, *et al.* (1994), Nautiyal (1999), Jones, *et al* (1991) y Whitelaw (1999) mencionan que existen contradicciones entre la detección de un halo de solubilización en el

medio sólido y la solubilización de los fosfatos en medio líquido, debido a que muchos de los aislamientos no producen halo de solubilización en medio sólido, lo cual no necesariamente indica que el organismo carezca de capacidad solubilizadora, sino que es posible que este tipo de medios sea insensible a la detección de la actividad del microorganismo, siendo capaces de solubilizar varias fuentes de fosfatos en medio líquido.

Además, los hongos tienen la capacidad de almacenar el P como sustancia de reserva, en forma de polifosfatos dentro de las vacuolas celulares (Carlile *et al.*, 2001), sin que esto requiera necesariamente la solubilización del mineral.

Por otro lado Kucey (1983) menciona que los hongos solubilizadores de P muestran una mayor actividad en medio sólido y líquido en comparación a las bacterias según estudios realizados por Sperber (1958), Kucey (1983), Venkateswarlu *et al.* (1984), y Darmwal *et al.* (1989).

Para el presente estudio se evaluaron los hongos en medio líquidos y los mismos no produjeron cambio de color ni de pH, por lo que se optó por la utilización de medios sólidos y la evaluación del halo de solubilización a los 5 días, como medida de la capacidad solubilizadora de fósforo. En la figura 16 se puede observar, el radio de crecimiento del halo de solubilización de los diferentes hongos probados *in vitro*. Como se mencionó anteriormente el hongo HRR-20 presentó el mayor crecimiento, sin embargo, las diferencias con respecto a los demás hongos incluidos en el análisis estadístico no son significativas. Se incluye en la figura 16 el hongo HRR-52 que logró crecer normalmente pero no produjo viraje de color por lo que no se incluyó en el análisis.

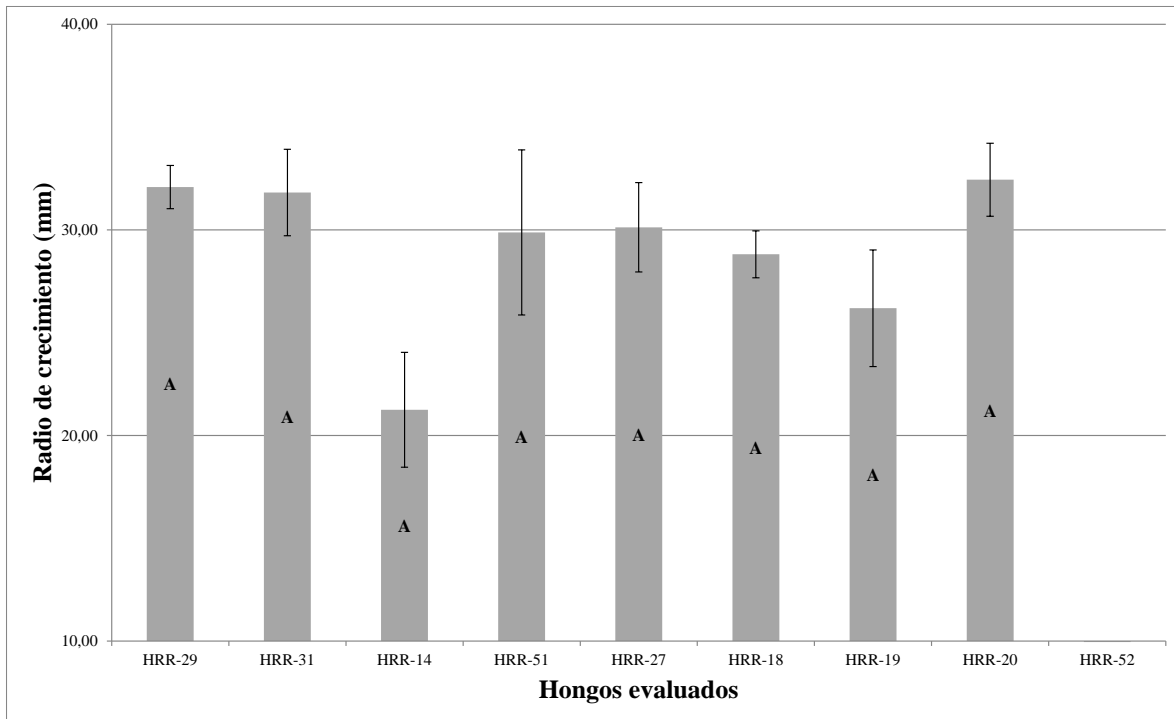


Figura 16. Crecimiento de halo de solubilización de hongos en prueba in vitro. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.

En cuanto a las pruebas in vitro realizadas a bacterias y levaduras en medio de Osorio y Habte (2001) modificado, se puede observar en la figura 17, los cambios en la coloración del medio a los 7 días de las inoculaciones, correspondientes a la levadura LRR-9 (Figura 17, A) y la bacteria BRR-19 (Figura 17, B), así como la permanencia en el color azul del medio cuando se trata del testigo (Figura 17, C), al no tener inoculación de ningún microorganismo.

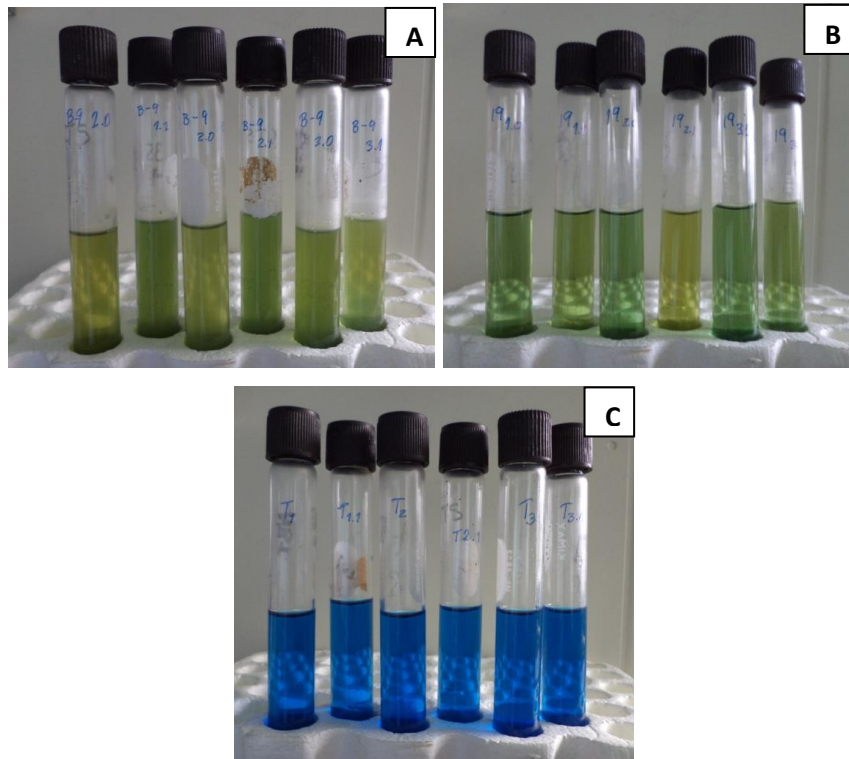


Figura 17. Pruebas de solubilización de P para bacterias y levaduras, a los 7 días después de la inoculación en condiciones de 27°C de temperatura y 200rpm de agitación. A) Levadura LRR-9, B) Bacteria BRR-19 y C) Testigo. San Pedro, San José. 2015.

En el caso del pH, se observó una marcada diferencia entre los microorganismos con respecto al testigo (Figura 18 y 19), sobretodo en el caso de las levaduras, donde se presentó una mayor disminución del pH con respecto al control (Figura 19).

Lo anterior refuerza la idea mencionada anteriormente en el caso de los hongos, que la disminución de pH se debe principalmente a la producción de ácidos orgánicos por parte de los microorganismos, como la vía principal para la solubilización de los fosfatos (Cordero, *et al.* 2008; Gómez-Guiñan y Zabala, 2001; Pradham y Sukla, 2005).

Goldstein (1995) menciona que en el caso de algunas bacterias Gram negativas (como es el caso de las utilizadas en estos ensayos), la base metabólica de producción de ácidos orgánicos se da por medio de la oxidación periplásmica directa de la glucosa a ácido glucónico o a ácido 2-cetoglucónico.

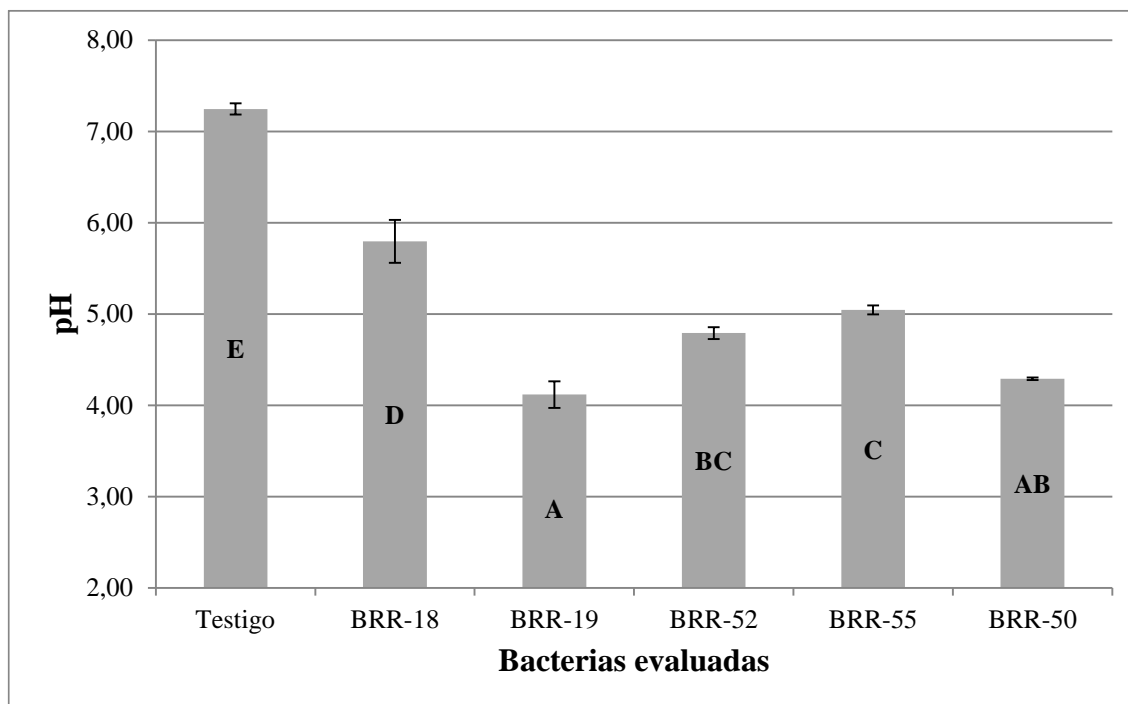


Figura 18. pH del medio en las pruebas de solubilización de las bacterias evaluadas *in vitro*, a los 7 días después de la inoculación. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.

Cordero, *et al.* (2008), menciona que en el caso de las pruebas con *Pantoea sp.* en medio líquido, se obtuvo una disminución del pH del medio de 7,0 a 4,65; y en la cantidad de P en solución se obtuvo  $1128 \mu\text{g P.mL}^{-1}$ , lo cual superó las cantidades reportadas por otros autores con otros microorganismos, como es el caso de *Enterobacter absuriae*, la cual solubilizó entre 38 y  $510 \mu\text{g P.mL}^{-1}$  en medio líquido (Gyaneshwar, *et al.* 1999) o el caso de *Paecilomyces lilacinus* el cual solubilizó  $71,28 \text{ mg.L}^{-1}$  de fósforo en el medio con fosfato de calcio a los 12 días de crecimiento (Hernández, *et al.* 2011).

En otro estudio realizado por Kim, *et al* (1997) se utilizó para la inoculación de plantas de tomate, a *Glomus etunicatum* como hongo y a *Enterobacter agglomerans* como bacteria, ambos microorganismos capaces de solubilizar fosfatos insolubles, los autores encontraron que la producción de acidez fue el principal mecanismo para la solubilización de roca fosfórica bajo condiciones *in vitro*.

En la presente investigación, el pH del medio pasó de un 7,24 del testigo, a 4,12 en el caso de la BRR-19, la cual resultó ser la medida más baja de todas las bacterias inoculadas

(Figura 18). En el caso de las levaduras, el microorganismo que logró reducir más el pH del medio fue la LRR-51 con 3,84 (Figura 19).

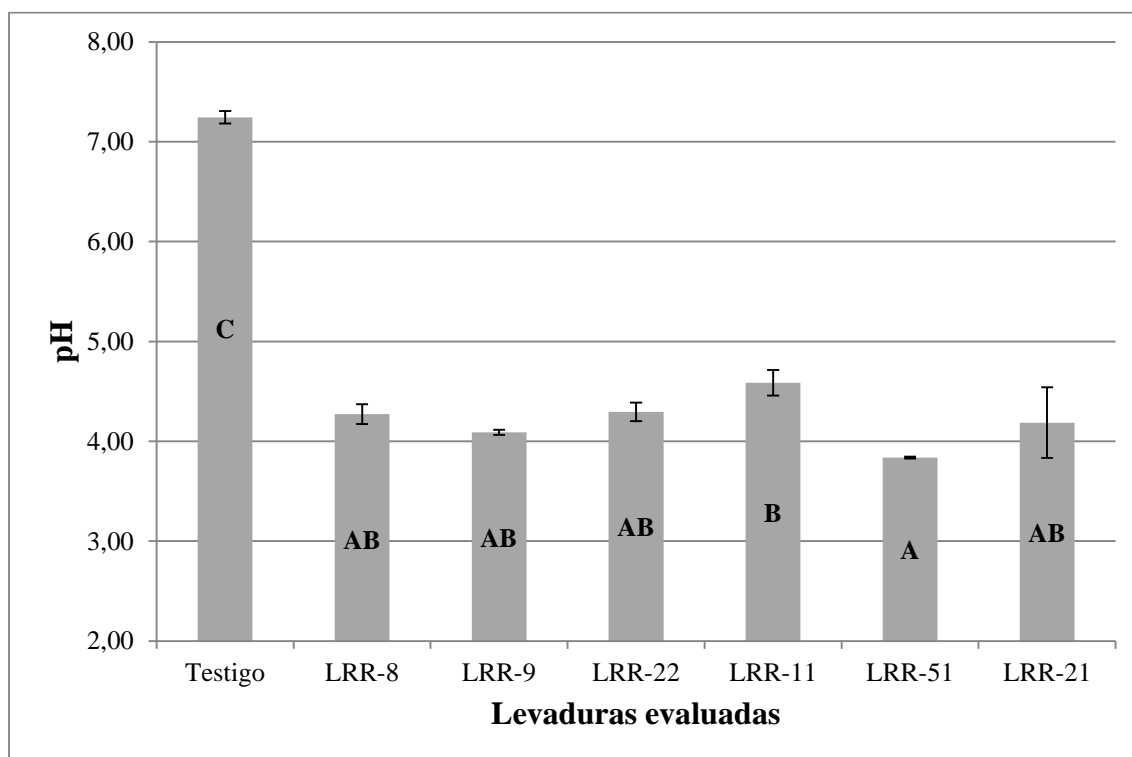


Figura 19. pH del medio en las pruebas de solubilización de las levaduras evaluadas *in vitro*, a los 7 días después de la inoculación. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.

Para el parámetro de fósforo en solución, se observa en la Figura 20, que la bacteria BRR-19 es la que presenta los valores más altos con  $3,81 \text{ mg P.L}^{-1}$ , lo cual concuerda con los valores más bajos que se obtuvieron para el parámetro de pH, con respecto a todas las bacterias analizadas.

Por otro lado, las levaduras presentan una solubilización de P más alta comparada con las bacterias, ya que para estos microorganismos, la cantidad de P solubilizado mayor fue la de LRR-9 con  $17,40 \text{ mgP.L}^{-1}$  (Figura 21).

En este caso no se da una relación tan directa entre el pH y el contenido de P en solución como en el caso de los medios inoculados con las bacterias, ya que la levadura

LRR-51 que presentó el pH más bajo de todos los organismos probados, no presentó la mayor solubilización de P (figuras 19 y 21).

Si se comparan ambos resultados con un  $1,63 \text{ mg P.L}^{-1}$  que se registró para el testigo, se concluye que, las levaduras a nivel *in vitro*, presentan una solubilización de P más eficiente con respecto a las bacterias.

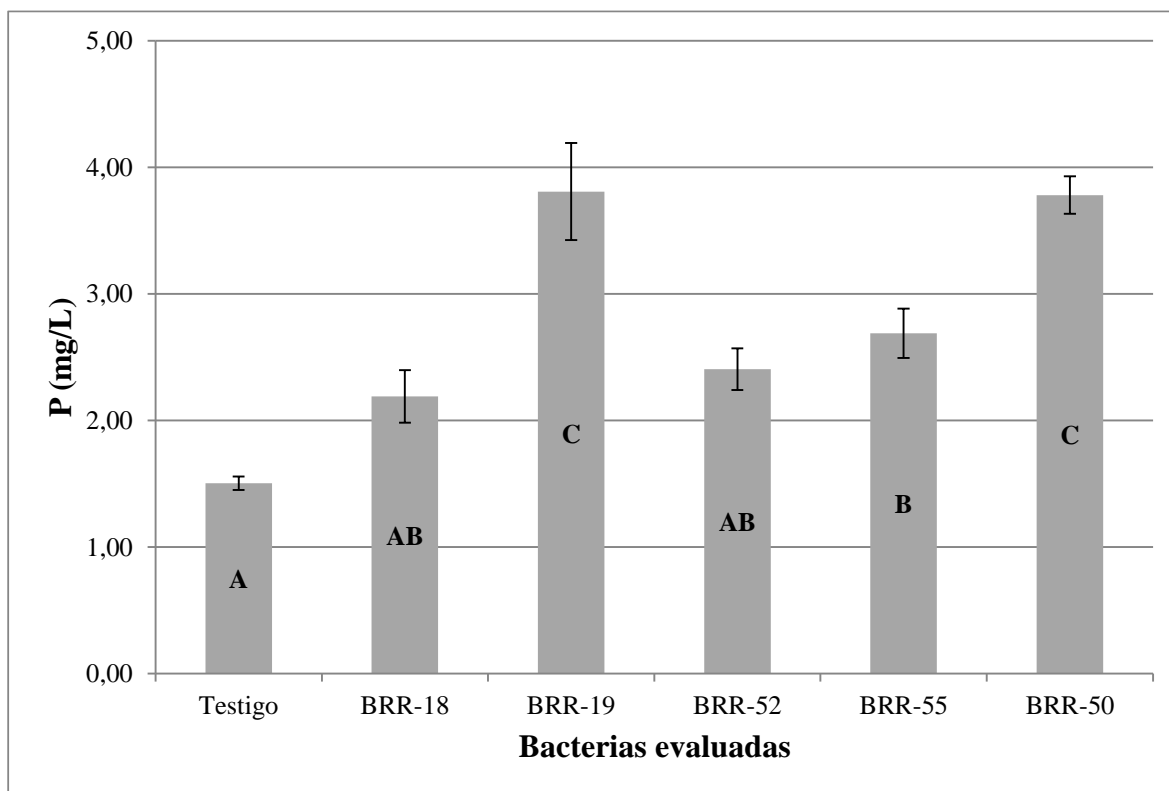


Figura 20. Concentración de fósforo en solución para las pruebas de solubilización de bacterias evaluadas *in vitro*, a los 7 días después de la inoculación. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.

La cantidad de fósforo solubilizado por los microorganismos aislados está por debajo de los niveles reportados por Cordero, *et al.* (2008) para *Pantoea* sp. ( $1128 \text{ mgP.L}^{-1}$ ), sin embargo estos se acercan más al rango presentado por Gyaneshwar, *et al.* (1999) ( $3,8-51 \text{ mgP.L}^{-1}$ ) para *Enterobacter absuriae* y Hernández, *et al.* (2011) para *Paecilomyces*



*lilacinus* (71,28 mg.L<sup>-1</sup>). Esto sugiere que las cantidades de P solubilizado varían con los métodos utilizados para su evaluación y entre microorganismos y su habilidad para la solubilización de este nutriente.

La acidez del medio y la solubilización de fosfatos dependen de varios factores, como la capacidad solubilizadora del organismo, los ácidos orgánicos producidos, el tipo de compuesto fosfatado, así como la fuente de C y N que se utilicen para el medio (Barroso y Nahas, 2005; Pradham y Sukla, 2005; Souchie *et al.*, 2006).

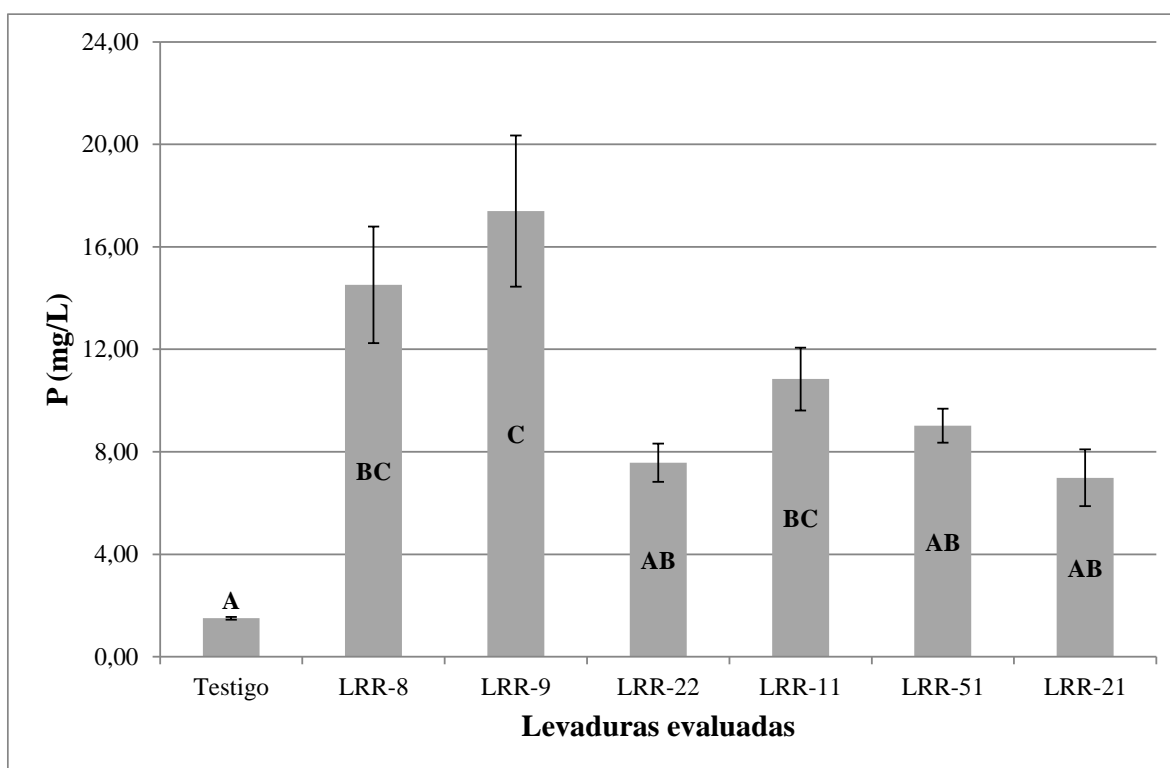


Figura 21. Concentración de fósforo en solución para las pruebas de solubilización de levaduras evaluadas in vitro, a los 7 días después de la inoculación. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.

## **Evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo a nivel de invernadero.**

Se eligieron de los microorganismos evaluados in vitro, en el caso de las bacterias y levaduras, aquellos que presentaron una mayor solubilización de P y una mayor reducción del pH; y en el caso de los hongos se eligió el que produjo un mayor halo de solubilización. Fueron escogidos el hongo HRR-20, la bacteria BRR-19 y la levadura LRR-9.

Estos microorganismos fueron identificados en el Laboratorio de Técnicas Moleculares del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC), utilizando el Gen Bank-NCBI (BLAST) como referencia. En el caso de la levadura LRR-9, se obtuvo un 99% de correspondencia con *Wickerhamomyces anomalus* también conocida como *Pichia anomala* o *Hansenula anómala* (Figura 22, B). En el caso de BRR-19 se obtuvo de igual manera un 99% de correspondencia con *Pseudomonas fragi* (Figura 22, A) y en el caso del hongo HRR-20, se obtuvo 100% de similitud con *Aspergillus flavus* (Figura 22, C). Además se utilizó también la cepa de *Azospirillum oryzae* PC J1-CIA-UCR como parte de los tratamientos.

De los microorganismos aislados y probados en este ensayo, se tiene poca información de sus funciones como solubilizadores de P. No obstante Rashid, *et al* (2004), realizaron un ensayo para determinar la capacidad de producción de ácidos orgánicos y la consecuente solubilización de fosfatos en condiciones in vitro de diez cepas bacterianas y tres cepas de hongos (*Aspergillus flavus* (1RF), *Penicillium canescens* (4RF) y *Aspergillus niger* (8RF)). En este ensayo se obtuvo que todos los microorganismos produjeron ácidos glucónico, fumárico, succínico, acético y otros ácidos en cantidades pequeñas, mientras que en cantidades mayores, produjeron ácido oxálico y cítrico, y específicamente *Aspergillus flavus* produjo cantidades mayores de ácidos en comparación a las otras cepas de hongos.

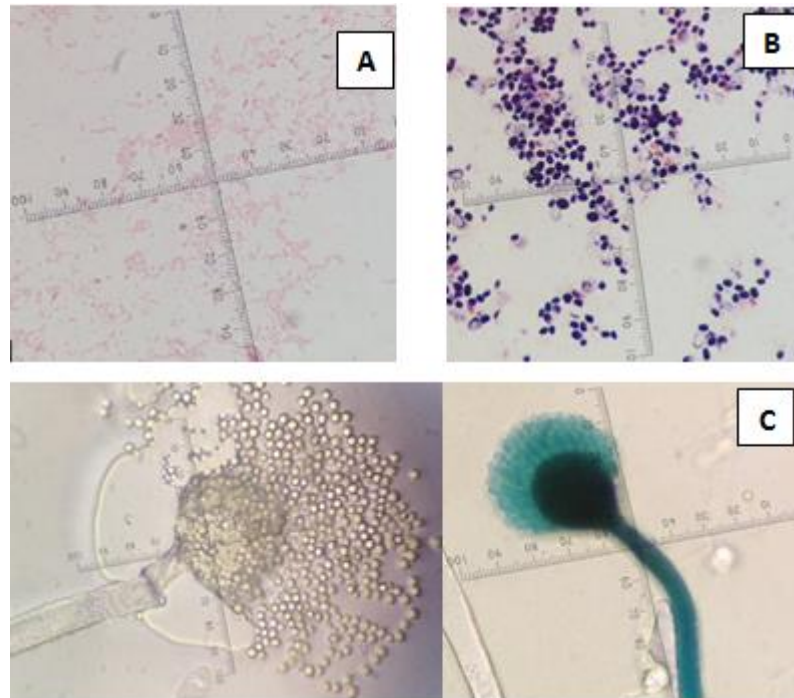


Figura 22. Tinción de Gram y observación microscópica realizada a los microorganismos seleccionados para el ensayo en invernadero. A) BRR-19 (bacteria Gram negativa) y B) LRR-9 (levadura); C) conidióforo y cabeza aspergilar de HRR-20 (hongo). Todas las observaciones realizadas por medio de microscopio con aumento de 100x. San Pedro, San José. 2015.

Por otro lado, Selvakumar, *et al* (2009) reportan la solubilización de P y la promoción en el crecimiento de plantas de trigo por medio de *Pseudomonas fragi* CS11RH1. Esta bacteria fue aislada de la rizósfera de plantas de ajo, crece y solubiliza P a temperaturas entre los 4° y 30°C y tiene la capacidad de producir ácido indolacético (IAA) y cianuro de hidrógeno (HCN). Esta bacteria normalmente se relaciona con el deterioro de productos lácteos almacenados a temperaturas bajas, y el único informe encontrado, además de Selvakumar, *et al* (2009), que reporta la solubilización de P por parte de esta bacteria fue hecho por Martin, *et al* (2003) en plantas de fresa, las cuales presentaron mayores porcentajes de P que las plantas no inoculadas con dicha bacteria.

En cuanto a la levadura, *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala* o *Hansenula anómala*), no se tienen reportes de capacidad de solubilización de fosfatos para este

organismo, no obstante, Nakamura, *et al* (2000), hace mención de esta levadura, como un organismo capaz de secretar fitasas.

Además el Joint Genome Institute (2016) de los Estados Unidos, reporta que *Wickerhamomyces anomalus* contribuye al aroma del vino a través de la producción de compuestos volátiles, además de estar asociada frecuentemente con el deterioro o la transformación de los alimentos y productos de granos. En los últimos años se ha utilizado como un agente de biocontrol contra otros hongos debido a su capacidad de producir toxinas (mycocin).

### **Variables evaluadas en ensayo de invernadero.**

De acuerdo a las variables evaluadas en el presente ensayo, el peso fresco aéreo, altura de planta y peso seco aéreo, no mostraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tratamientos, aunque los mayores pesos (en fresco y en seco) se obtuvieron para los tratamientos T, H y B+A (Cuadro 6). Por otro lado aquellas variables que incluyeron la parte radical de las plantas si mostraron diferencias significativas entre tratamientos (Figuras 23, 24, 25y 26).

Otros autores han encontrado un mayor crecimiento de las plantas inoculadas con microorganismos solubilizadores de P en comparación a las no inoculadas. López, *et al* (2008) encontró diferencias significativas en la altura de planta, largo y ancho de hoja de las plantas de maíz (*Zea mays*) inoculadas con *Bacillus megatherium* var. *Phosphaticum* (solubilizador de P) y *Azotobacter* sp. (fijador de N), en comparación al testigo.

También Echeverría (2012), reportó un aumento en el crecimiento aéreo y radical, además de una mayor absorción de fósforo y nitrógeno, en plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) inoculadas con *Pseudomonas fluorescens*.

Cuadro 6. Pesos frescos, pesos secos y altura de parte aérea de plantas de arroz a los 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos probados en invernadero. San Pedro, San José. 2015.

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso Fresco Aéreo (g)</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>Peso Seco Aéreo (g)</b>
<b>Testigo</b>	3,46	49,65	0,92
<b>T. <i>Azospirillum</i></b>	3,34	48,51	0,82
<b>Hongo</b>	3,38	49,19	0,89
<b>Hongo+<i>Azospirillum</i></b>	3,28	48,64	0,87
<b>Levadura</b>	3,29	48,63	0,82
<b>Levadura+<i>Azospirillum</i></b>	3,22	48,36	0,83
<b>Bacteria</b>	3,27	48,27	0,82
<b>Bacteria+<i>Azospirillum</i></b>	3,39	48,50	0,89
<b>Hongo+Bacteria+Levadura+<i>Azospirillum</i></b>	3,33	49,09	0,88

### **Peso fresco y seco radical.**

En la figura 23 se muestra la variable de peso seco y peso fresco radical de las plantas de arroz para los diferentes tratamientos, siendo el valor más alto para el peso fresco radical el tratamiento testigo con 1,64g. Todos los demás tratamientos obtuvieron pesos estadísticamente menores al testigo, obteniendo el valor más bajo el tratamiento de bacteria con 0,61g.

La variable peso seco radical muestra un comportamiento diferente, ya que el testigo y la levadura muestran los valores más bajos, mientras que los tratamientos TA, H y H+A presentaron los mayores valores.

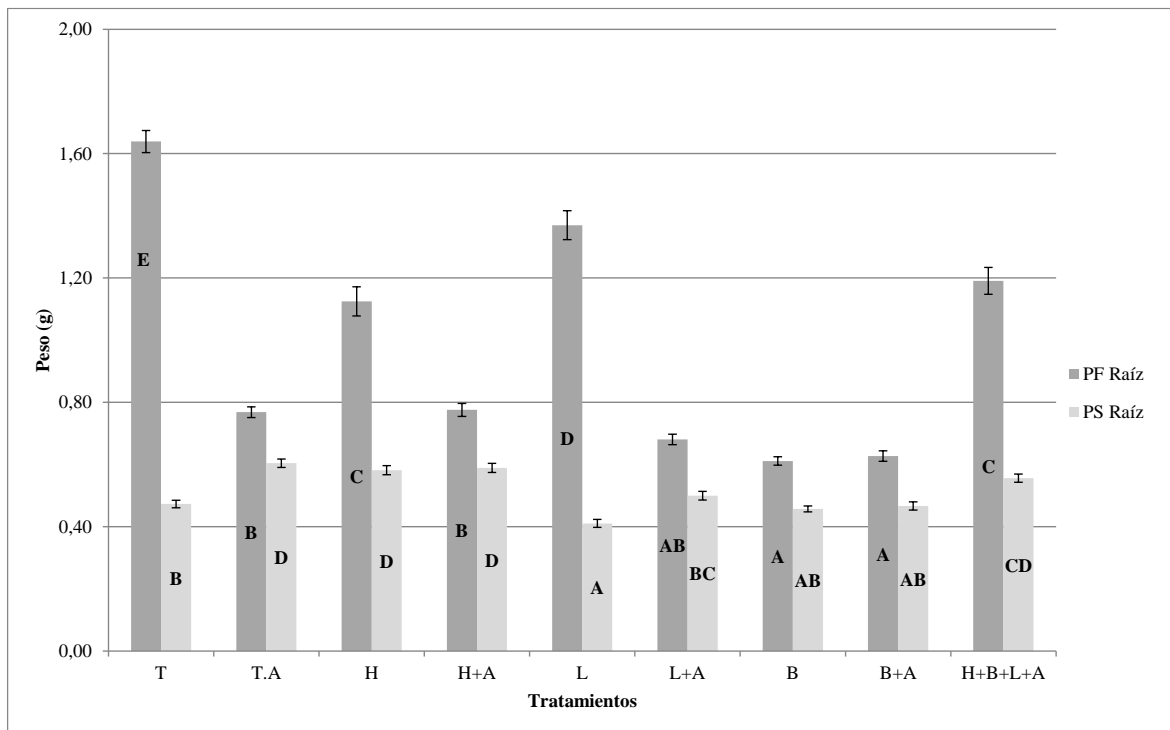


Figura 23. Peso fresco y seco radical de plantas de arroz de 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.

López, *et al* (2008) y Martínez-Viera, *et al* (2007) mencionan que para el caso de bacterias fijadoras de N de forma asociativa, como es el caso de *Azospirillum oryzae*, es conocido que estas actúen como rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR), ya que sintetizan altas cantidades de sustancias activas reguladoras del crecimiento.

Este tipo de bacterias (PGPR) puede estimular el crecimiento radical considerablemente, mejorando la disponibilidad de nutrientes, produciendo fitohormonas o mediante la inhibición de patógenos (Lugtenberg *et al.* 1991; Dutta y Podile, 2010; Ramírez, *et al.* 2014). En el caso de *Azospirillum*, que es una bacteria diazotrófica, se da el mejoramiento en la obtención de N (Rodríguez *et al.*, 2008), además estimula el crecimiento radical y la formación de raíces laterales y pelos radicales, lo cual mejora la adquisición de nutrientes, lo anterior tiene un efecto especialmente importante en el caso del P (Lynch *et al.* 2012).

Según Glick (1995), este efecto actúa directamente sobre el desarrollo de las plantas y el conjunto de sustancias que son asimiladas a través de las raíces, que permite que cada una de estos reguladores del crecimiento actúe en el momento en que la planta lo requiera. Lo anterior lo reafirma también Echeverría (2012), el cual menciona que las rizobacterias pueden sintetizar fitohormonas como las auxinas, que ayudan al desarrollo de las plantas.

Además, según Okon y Kapulnik (1986) citados por Zaady y Perevolotsky (1995), la inoculación con *Azospirillum* incrementa la producción de materia seca, sin embargo este efecto puede ser benéfico en algunos casos o no significativo en otros (Saito y Graciolli, 1981).

Para el presente estudio la inoculación con *Azospirillum oryzae* (T.A), *Aspergillus flavus* (H) y la co-inoculación de ambos organismos (H+A) a las plantas de arroz, generaron los mayores valores para la variable peso seco radical (0,60g para T.A; 0,59g para H+A; y 0,58g para H), indicando una mayor acumulación de materia seca en las raíces de las plantas inoculadas con estos microorganismos (Figura 23).

Se ha probado, en otros casos, como la inoculación con *Azospirillum* ha promovido el crecimiento de plantas de importancia agronómica en un 10-20 % (Okon, 1985; Summer, 1990; citados por Zaady y Perevolotsky, 1995). Según Motsara *et al.* (1995) en cultivos como arroz, maíz, trigo y caña de azúcar, *Azospirillum* puede incrementar el rendimiento entre el 15 y el 30 %. En Cuba se han utilizado biofertilizantes a base de esta bacteria que permiten la sustitución del 25% del fertilizante nitrogenado en arroz e incrementan el rendimiento entre el 5 y el 15% (The Latin American Alliance, 1997).

Además, la inoculación con *Aspergillus flavus* (H) generó igualmente, respuesta de parte de las plantas al evaluar el peso seco radical, este género es uno de los más importantes en cuanto a la solubilización de P en el suelo (Motsara, *et al.* 1995) (Tratamiento H, Figura 23).

## Longitud de la raíz principal.

En la figura 24 se muestra las diferentes longitudes de la raíz principal en las plantas de arroz de acuerdo a los tratamientos. Se puede observar que para esta variable, el tratamiento que presentó una mayor longitud de la raíz principal, es de nuevo el testigo con 24,36cm; mientras que la menor longitud radical corresponde al tratamiento de *Aspergillus flavus* junto con *Azospirillum oryzae* (H+A), con 19,43cm (Anexo 7).

A pesar de que se presentan diferencias significativas entre algunos de los tratamientos por ejemplo T y H+A, algunos de ellos comparten la asignación de una misma letra, por lo que no se dan diferencias significativas entre los mismos.

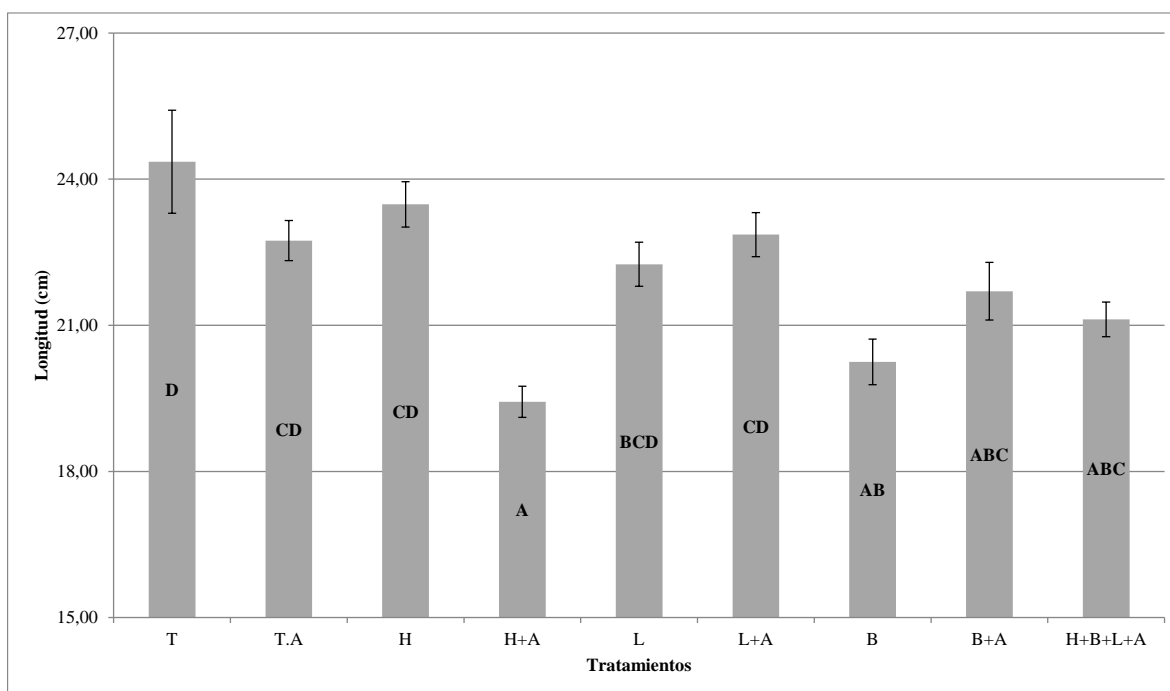


Figura 24. Longitud de raíz principal de plantas de arroz de 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos evaluados en invernadero. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.



En el caso de la variable de longitud de la raíz principal se podría deducir que el hecho de que el testigo presente una mayor longitud se debe a la necesidad de la planta de explorar una mayor superficie de suelo en busca de nutrientes.

Foehse y Jungk (1983) y Gahoonia, *et al* (2001), mencionan que bajo condiciones de deficiencia de P en el suelo, las plantas aumentan el crecimiento de las raíces, de los pelos radicales y/o la densidad radical, además de disminuir también el diámetro de las raíces con el fin de conseguir cubrir una mayor área superficial de suelo explorado por las raíces en busca de este elemento.

Además, según lo que se puede observar en el cuadro 6, no se presentan diferencias significativas entre tratamientos para las variables de peso fresco y seco de parte aérea, y altura de plantas. Lo cual muestra que en el caso de las plantas del tratamiento Testigo, fue necesario un mayor crecimiento de raíz comparado a las plantas del tratamiento de *Aspergillus flavus* junto con *Azospirillum oryzae* (H+A), para alcanzar alturas y pesos de follaje estadísticamente iguales.

### **Densidad longitudinal radical.**

La variable densidad longitudinal radical, calculada mediante la fórmula: longitud de la raíz principal (cm)/ volumen de suelo (cc), presenta el valor más alto en el tratamiento testigo (T) con un valor de 0,12 cm/cc, mientras que los valores más bajos se obtuvieron para del tratamiento de *Aspergillus flavus* junto con *Azospirillum oryzae* (H+A), con valores de 0,10 cm/cc; valores concordantes con la variable de longitud de la raíz principal, anteriormente expuestos (Figura 25).

Según los autores Foehse y Jungk (1983) y Gahoonia, *et al* (2001), se podría relacionar la inoculación de microorganismos realizada a las plantas de arroz con el crecimiento y comportamiento de las raíces. En el caso del testigo, al no realizar inoculaciones de los microorganismos en estudio, se presenta una mayor dificultad en cuanto al crecimiento normal de la planta, y como consecuencia se aumenta la densidad y longitud de las raíces.

Esta situación es contraria en el caso del tratamiento de *Aspergillus flavus* junto con *Azospirillum oryzae* (H+A), en el cual se presentan las menores densidades y longitudes de raíz como consecuencia a la inoculación de dichos microorganismos que facilitan el crecimiento de la planta.

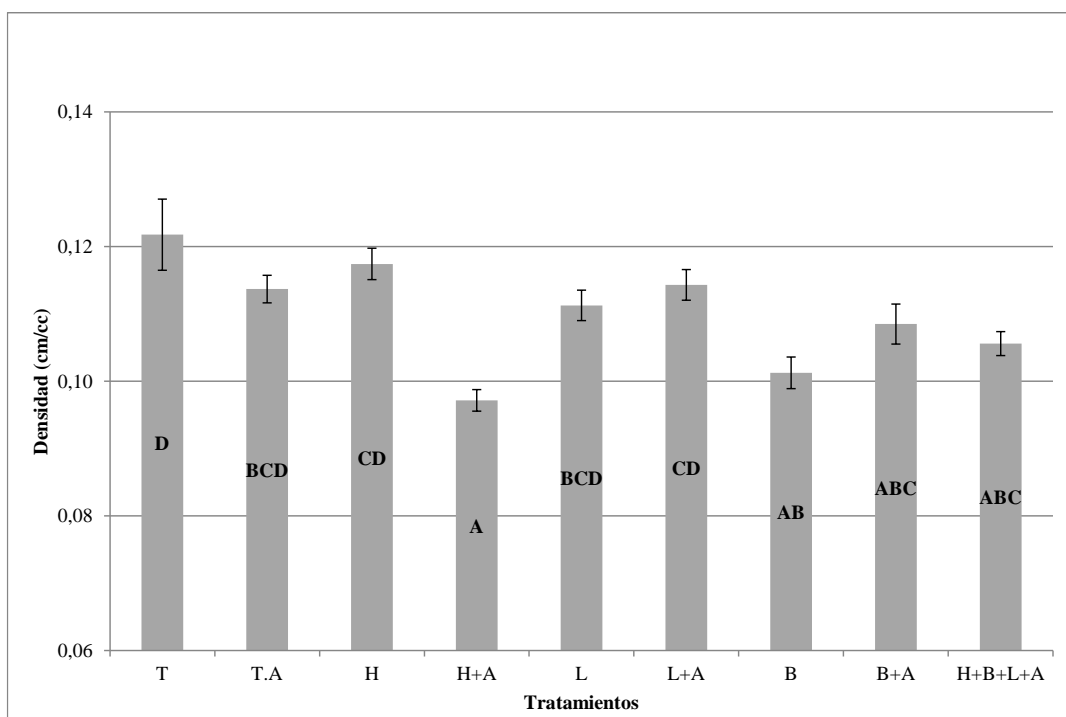


Figura 25. Densidad longitudinal radical (cm/cc) de plantas de arroz de 102 días, bajo diferentes tratamientos evaluados en invernadero. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.

### Índice raíz/tallo.

En la figura 26 y 27 se muestra la relación de los pesos frescos y secos de raíz con respecto a la parte aérea, y el correspondiente índice raíz/tallo, determinado con la fórmula: Índice = peso de raíz/peso foliar.

Este índice depende principalmente de la concentración de nutrientes en el suelo o en la solución del suelo y las condiciones físicas, químicas y microbiológicas del sustrato,

que puede afectar la formación de raíces y su actividad (Lynch, *et al.* 2012); además este índice varía entre especies, y es fuertemente modificado por factores externos, no obstante un importante mecanismo que regula este índice, es el control hormonal de las plantas debido a que se habla de un “equilibrio funcional” el cual ellas deben mantener (Lynch, *et al.* 2012).

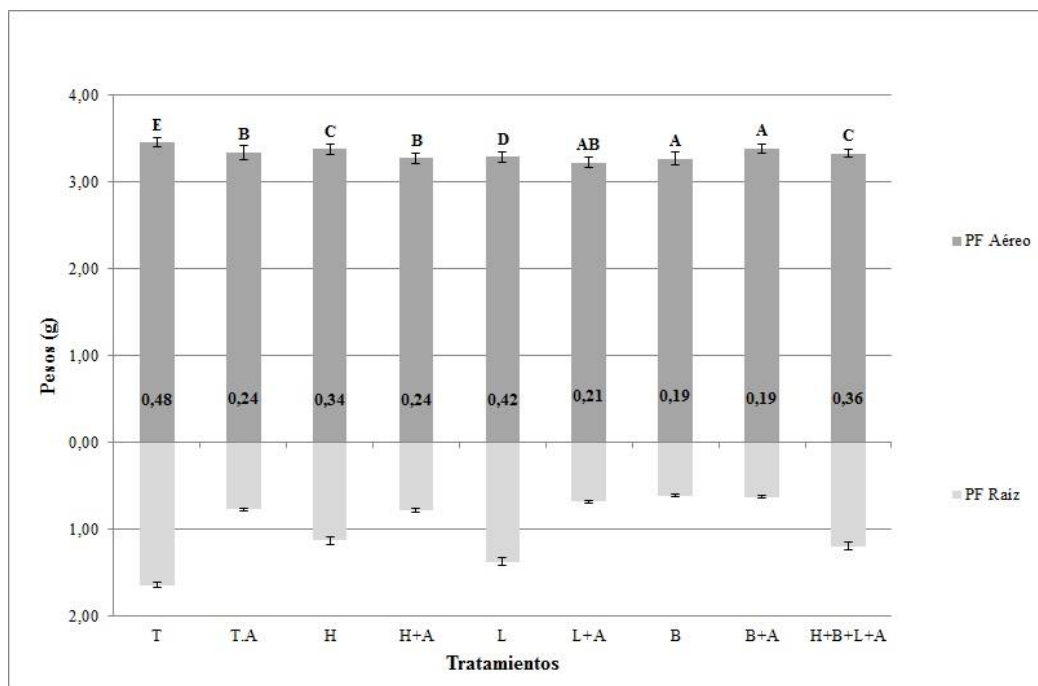


Figura 26. Relación de pesos frescos de raíz sobre pesos frescos de parte aérea (Índice raíz/tallo en fresco) de plantas de arroz de 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos evaluados en invernadero. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.

Para esta variable, todos los tratamientos presentaron un peso de raíz menor al peso correspondiente a la parte aérea. Estas diferencias fueron más marcadas en los pesos frescos que en los pesos secos, donde la relación se acerca más a 1.

En estos casos, Pellny *et al* (2008), mencionan que valores mayores a 1, significan un alto status de N en las plantas, lo cual para los resultados de este ensayo significa valores deficientes de este elemento (Figura 26 y 27). Este índice está correlacionado con la

relación aminos/nitratos en la raíz, la cual interactúa con la señalización del ácido giberélico y las vías respiratorias para regular el reparto de biomasa entre la parte aérea y las raíces.

Los tratamientos donde se asemejan un poco más las dos relaciones (índice raíz/tallo en fresco y seco) son en el testigo, seguido por la levadura con 0,05 y 0,09 de diferencia entre los índices respectivamente. Estos dos tratamientos, Testigo y Levadura son al mismo tiempo, aquellos con los valores más bajos para el índice en seco, lo cual sugiere que las raíces en estos casos tenían mayor contenido de agua, comparado a los otros tratamientos.

En este mismo sentido, el testigo presentó el mayor largo de la raíz principal y la mayor densidad longitudinal radical; esto posiblemente debido a una mayor dificultad por parte de las plantas de este tratamiento de obtener nutrientes. Lo anterior, por la falta de inoculación de los microorganismos específicos en estudio que pueden facilitar la obtención de los mismos y los mecanismos utilizados por parte de las plantas para obtener los nutrientes del suelo, los cuales incluyen aumentar el largo de raíces y la densidad radical (Foehse y Jungk, 1983; Gahoonia, *et al* 2001).

Lynch *et al* (2012) mencionan que aquellos suelos con deficiencias nutricionales se correlacionan con un aumento en el crecimiento de raíces, y específicamente con deficiencias de P, las plantas incrementan la longitud de raíces y producen raíces más finas, con el fin de aumentar el área superficial radical y así mejorar la adquisición de P del suelo.

Lo anterior lo refuerzan Cakmak *et al* (2000) y Nigussie *et al* (2003), los cuales mencionan que bajo deficiencia de nutrientes, se da la inhibición del crecimiento de parte aérea, acompañado con la continuación o incluso la mejora en el crecimiento de las raíces, lo cual refleja una alteración en cuanto a la distribución de los fotoasimilados (Liu, *et al*. 2005).

Por otro lado, donde se encontraron los mayores valores de Índice raíz/tallo en seco, fue en los tratamientos *Azospirillum oryzae*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus flavus* junto con *Azospirillum oryzae* (TA, H y H+A). Se puede pensar que en estos tratamientos, las plantas tuvieron un mayor acceso a los nutrientes del suelo, específicamente P y N, debido a la acción específica de los microorganismos inoculados para la obtención de estos

nutrientes, lo que se ve reflejado en un peso más equilibrado de las raíces con respecto a la parte aérea.

Estos tratamientos (TA, H y H+A), a pesar de presentar menor crecimiento y densidad de raíces, propiciaron una mayor eficiencia en la utilización de recursos ya que con una longitud menor de raíz pero de mayor peso se obtuvieron plantas con el mismo desarrollo aéreo comparado a los demás tratamientos; que requirieron mayor desarrollo radical para lograr el mismo desarrollo foliar.

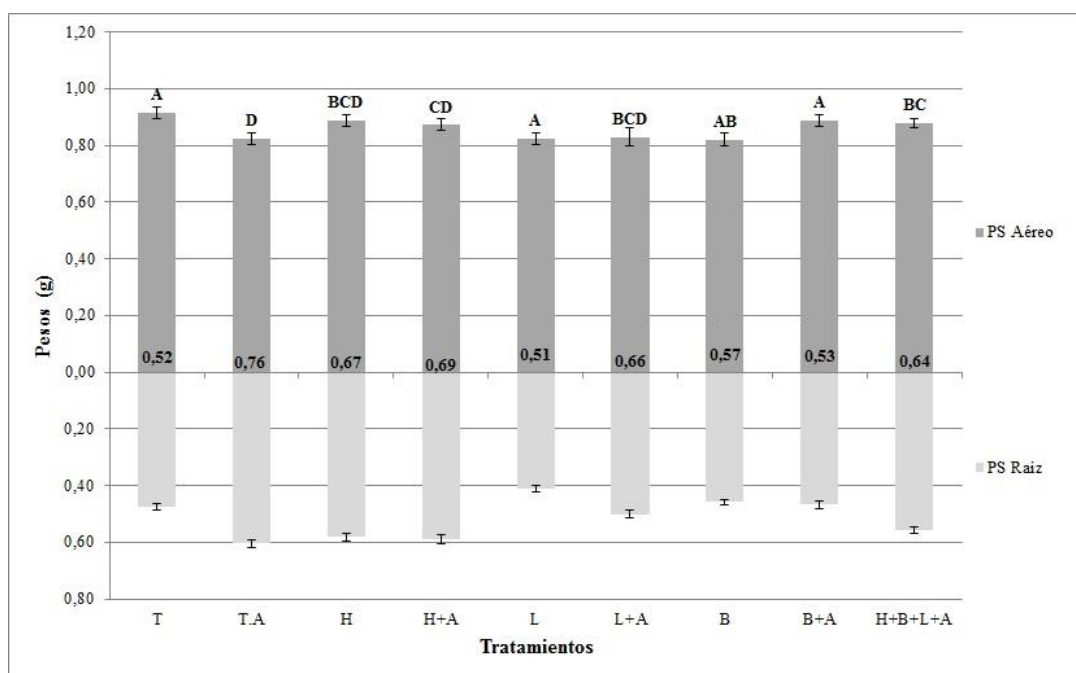


Figura 27. Relación de pesos secos de raíz sobre pesos secos de parte aérea (Índice raíz/tallo en seco) de plantas de arroz de 102 días después de su siembra, bajo diferentes tratamientos evaluados en invernadero. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.

Esto último concuerda con el “equilibrio funcional” al cual Lynch *et al* (2012) hacen referencia, donde las plantas de los tratamientos TA, H y H+A, requieren un menor desarrollo radical para mantener el mismo desarrollo foliar del resto de los tratamientos; y esta diferencia es generada por los microorganismos inoculados en dichos tratamientos (*Aspergillus flavus* y *Azospirillum oryzae*).

Los resultados anteriores constituyen un indicador de que los microorganismos pueden afectar el crecimiento y la producción de materia seca por medio del mejoramiento en la absorción de nutrientes del suelo, concordando así, con lo reportado por Echeverría (2012), López, *et al.* (2008), Martínez-Viera, *et al.* (2007) y Zaady y Perevolotsky (1995).

En este caso los tratamientos: *Azospirillum oryzae* (T.A), *Aspergillus flavus* (H) y *Aspergillus flavus* junto con *Azospirillum oryzae* (H+A) produjeron raíces con menor peso fresco pero mayor materia seca y menor longitud de la raíz principal comparados al testigo. Estas diferencias sin embargo no ocasionaron cambios en el peso fresco y seco aéreo de las plantas (Cuadro 6), posiblemente debido a que las limitaciones para el crecimiento normal de la planta se mantuvieron.

### Fósforo foliar.

Los análisis foliares no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Cuadro 7). Específicamente para P y además N, los contenidos fueron muy bajos comparados a los niveles críticos adecuados en los análisis foliares para el arroz, los cuales van de 2,6% a 4,2% en el caso del N, y de 0,25% a 0,48% en el caso del P según lo reportado por Rodríguez (1999).

Cuadro 7. Análisis foliar de plantas de arroz a los 102 días después de la siembra, bajo diferentes tratamientos probados en invernadero. San Pedro, San José. 2015.

Tratamiento	%					
	N	P	Ca	Mg	K	S
<b>Testigo</b>	1,06	0,14	0,34	0,20	2,23	0,17
<b>T.Azospirillum</b>	1,10	0,15	0,31	0,19	2,34	0,17
<b>Hongo</b>	1,12	0,15	0,30	0,20	2,31	0,17
<b>Hongo+Azospirillum</b>	1,07	0,14	0,31	0,19	2,30	0,17
<b>Levadura</b>	1,06	0,15	0,30	0,20	2,32	0,16
<b>Levadura+Azospirillum</b>	1,15	0,14	0,33	0,19	2,32	0,16
<b>Bacteria</b>	1,12	0,16	0,34	0,21	2,39	0,18
<b>Bacteria+Azospirillum</b>	1,10	0,14	0,31	0,19	2,17	0,17
<b>Hongo+Bacteria+Levadura+Azospirillum</b>	1,09	0,15	0,30	0,19	2,34	0,17

Este resultado difiere de muchos autores que han realizado este tipo de ensayos. Por ejemplo, Salih, *et al* (1989) mencionan que dos cepas de *Aspergillus foetidus* y una cepa de *Penicillium* sp. incrementaron el peso de las plantas y la adquisición de P en sorgo. Gaur *et al* (1980) encontró incrementos en la adquisición de P en plantas de trigo (*Triticum* spp.) y *Vigna radiata* inoculados con *Pseudomonas striata* y *Aspergillus awamori* junto con la aplicación de roca fosfórica. Kucey (1987, 1988) y Asea *et al* (1988), mencionan el incremento en el peso de plantas de trigo y los contenidos de P en las plantas con la inoculación de *Penicillium bilaii* tanto en experimentos de invernadero como en campo.

López *et al* (2008) realizaron un experimento en invernadero, donde se evaluó el efecto de *Azotobacter* sp. (cepa fijadora de N) y *Bacillus megatherium* var. *Phosphaticum* (cepa solubilizadora de fósforo) sobre el crecimiento de maíz en un suelo de alta fertilidad (Vertisol) y en uno de baja fertilidad (Ultisol), evaluando 8 tratamientos con dosis variables de fertilizante y en un caso sin fertilizar. En este ensayo se obtuvo, por ejemplo, que el tratamiento que no recibió fertilizante fosfórico, pero fue inoculado con el solubilizador de P, las plantas de maíz alcanzaron un desarrollo estadísticamente semejante al del tratamiento que recibió 100% de la dosis recomendada de fertilizante fosfórico, sin el microorganismo, indicando el papel efectivo que cumplieron las bacterias solubilizadoras en el suelo con baja fertilidad. Es importante mencionar, que en el ensayo de López *et al* (2008), no se obtuvieron diferencias significativas de parte de los solubilizadores de P en el Vertisol (alta fertilidad), solamente en el Ultisol.

También, en un estudio realizado por Cordero, *et al* (2008), en un suelo ferralítico rojo (Cambisol Ferrálico, Ródico) (Inceptisol) se probó en plantas de rábano, la bacteria *Pantoea* sp., la cual tiene la capacidad de solubilizar fosfatos y además, tiene características nitrificadoras. Esta bacteria se inoculó a los 18 días después de la siembra de las plantas, las cuales fueron fertilizadas con sulfato de amonio en razón equivalente a 100Kg N.ha<sup>-1</sup> y cloruro de potasio a razón de 100kg K<sub>2</sub>O.ha<sup>-1</sup>, además de fosfato tricálcico equivalente a 100Kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.ha<sup>-1</sup>, solamente en la mitad de los tratamientos. En este experimento se mostró que en las plantas inoculadas, se incrementó la presencia de P en las hojas, en un 60% con respecto a las plantas no inoculadas con la bacteria y en un 62% con respecto a las plantas que no fueron inoculadas y tampoco fueron fertilizadas.

Cordero, *et al* (2008) también hace mención de un estudio realizado por El-Komy (2005), en el cual se inocularon plantas de trigo con *B. megaterium* y *A. lipoferum*, además de realizar fertilizaciones con fosfatos de calcio y de potasio; en el cual el aumento de P en los tejidos de trigo fue de un 37% a un 53% en comparación con aquellas plantas que no fueron inoculadas

No obstante, hay algunos resultados reportados donde los microorganismos no produjeron un aumento en la absorción de P por parte de las plantas. Por ejemplo, en un estudio realizado por Nústez y Acevedo (2005), donde se probó *Penicillium janthinellum* *Biourge* aplicado en papa. En este ensayo se realizaron evaluaciones de diferentes niveles de fertilización con fósforo en conjunto con el biofertilizante Fosfosol®, cuyo ingrediente activo es el hongo mencionado anteriormente. Los resultados mostraron que no hubo respuesta a la aplicación del biofertilizante para las variables de concentración de P en tejido foliar en prefloración (el cual varió entre 0,14% y 0,34% sin diferencia entre tratamientos), materia seca de hojas, tallos y tubérculos en floración, gravedad específica y rendimiento del tubérculo (el cual estuvo entre 29,7 y 35,7 ton/ha).

Contrario a las investigaciones con resultados positivos citados anteriormente y de acuerdo a los objetivos de este estudio, de ensayar una metodología de evaluación de microorganismos con potencial de solubilización de P en Andisoles, no se utilizaron fertilizaciones fosfóricas; debido a ello los microorganismos utilizados no fueron capaces, bajo las condiciones evaluadas de promover un aumento en la concentración de P en el tejido foliar. Esto podría deberse a las características propias del suelo en estudio, como mencionan Osorio y Habte (2013), la adsorción de P inorgánico en suelos volcánicos es muy alta y representa un factor limitante en la eficiencia de fertilización y en la productividad de las plantas. Los autores mencionan que en suelos Andisoles, los materiales como la alofana, la ferrihedrita y la goetita son los responsables de la alta adsorción de P.

Con el fin de probar la efectividad de un hongo en la desorción del elemento en el suelo, Osorio y Habte (2013) realizaron un estudio con *Mortierella* sp., organismo conocido como solubilizador de P, en cuatro tipos de suelo que diferían en su mineralogía y por lo tanto en su capacidad de adsorción de P inorgánico. Obtuvieron, que este microorganismo fue efectivo para la desorción en todos los minerales probados excepto



para la alofana, y que esta desorción dependió de la producción de ácido oxálico por parte del organismo. La cantidad de P en solución según el tipo de material, que se obtuvo luego de la inoculación de *Mortierella* sp. fue ordenada de la siguiente manera, montmorillonita > caolinita > goetita > alofana.

En el caso de las alofanas, la desorción del elemento en el ensayo con *Mortierella* sp. fue extremadamente baja (0,001-0,005%), comparada con la desorción presentada en los otros minerales (caolinita = 3,73-5,45%, montmorillonita = 1,86-2,33% y goetita = 0,23-0,8%); lo cual es consistente con la fuerte adsorción de P en este mineral (Osorio y Habte, 2013).

Según lo expuesto por Osorio y Habte (2013) para *Mortierella* sp., las cantidades liberadas de P inorgánico a la solución, dependieron del mineral presente en el suelo, y de la cantidad de P inicialmente adsorbido en la superficie de los minerales. Este P liberado a la solución aumentó con el incremento en la cantidad de P inorgánico absorbido. En este mismo sentido Do Carmo Harta y Torrent (2007) mencionan que el incremento en la concentración de P inorgánico en la solución, depende de la fuerza con que el elemento es adsorbido en la superficie del mineral. Esta fuerza decrece conforme incrementa la saturación del elemento en los sitios de adsorción en la superficie del mineral.

La efectividad de los microorganismos para desorber P inorgánico, por tanto depende de la capacidad de adsorción del mineral. En el caso de las alofanas, la alta capacidad de adsorción del mineral fue aparentemente la responsable de la ineffectividad del hongo (*Mortierella* sp.) para desorber el P inorgánico, lo que probablemente provoque que en suelos donde esta mineralogía sea dominante (Andisoles), esta desorción no sea efectiva (Osorio y Habte 2013). También, He, *et al* (2002) encontraron que, una bacteria identificada como *Moraxella* sp. fue capaz de desorber P inorgánico de la superficie de la goetita, montmorillonita y la caolinita, no así en la alofana.

En el presente ensayo, se utilizó un Andisol entre los 1400 y los 2000 msnm, lo cual lo ubica, en el piso altitudinal medio, donde se da la mayor retención de P. Esto debido a que se forma una considerable cantidad de arcilla no cristalina acompañada de materia orgánica (Alvarado, *et al.* 2001). Además, Soto (1998) menciona que en los Andisoles de Costa Rica la cantidad de P total a una profundidad entre 0-0,4m oscila entre 817 y 5460 mg.Kg<sup>-1</sup>.

Debido a lo anterior, se podría deducir que este suelo presenta un alto potencial de adsorber P, ya que solo presentó un contenido de P total de  $900 \text{ mg.L}^{-1}$  (Cuadro 2). Esto pudo afectar la eficiencia de los microorganismos evaluados, haciéndolos poco eficientes en hacer disponible este elemento para las plantas, por lo que los tratamientos en los cuales se realizaron inoculaciones, no afectaron las concentraciones foliares de este elemento (Cuadro 7).

Sin embargo al realizar el recuento de los microorganismos solubilizadores de P presentes en el suelo 3 meses después de la cosecha, se determinó que la población fue casi 100 veces mayor en el tratamiento con *Aspergillus flavus* (H) en comparación al control (T) (Figura 28) atribuido a la sobrevivencia y reproducción del microorganismo en el suelo. Por otro lado, la cantidad de P soluble en el suelo fue  $2,67 \text{ mg.L}^{-1} \cdot 6 \text{ meses}^{-1}$  mayor en este mismo tratamiento con respecto al Testigo (Figura 29).

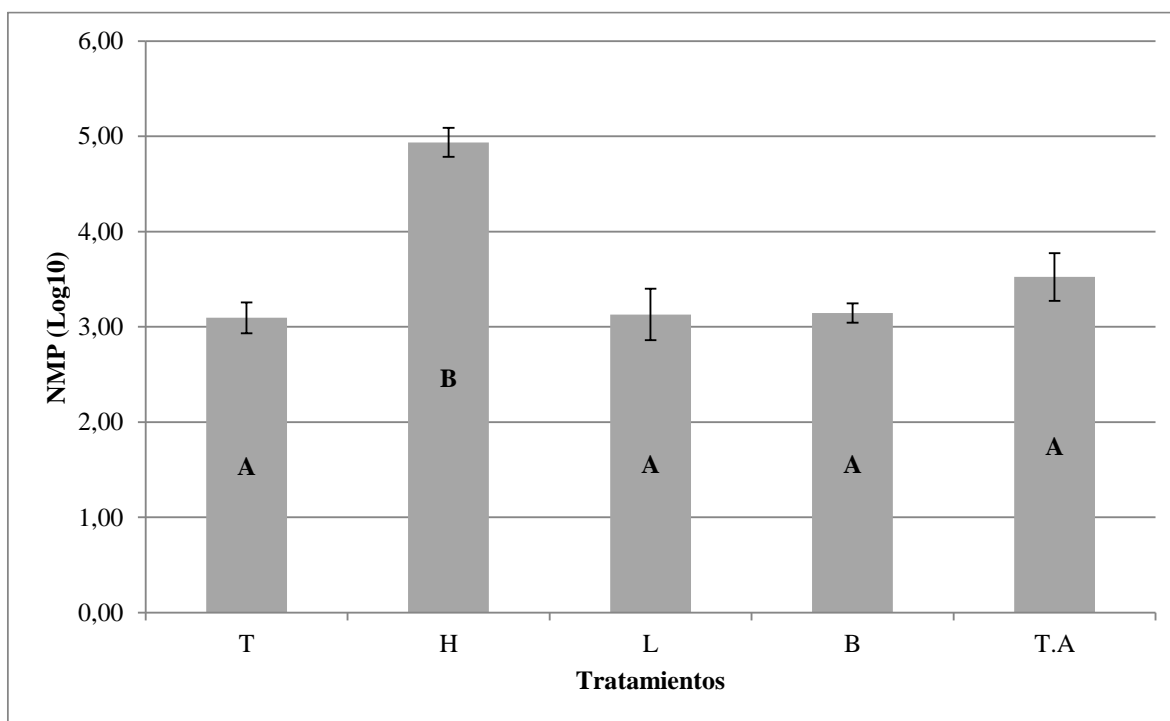


Figura 28. Población de microorganismos presentes en el suelo 3 meses después de la cosecha de las plantas de arroz. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.

Este aumento de 2,67 mg.L<sup>-1</sup> en 6 meses para la concentración del P disponible en el suelo con *Aspergillus flavus* (H) comparado al testigo, es poco, sin embargo, Alvarado, *et al* (2009), indican que es necesaria la aplicación de al menos 450 Kg.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para conseguir un aumento de 2-3 mg.L<sup>-1</sup>.año de P en la solución del suelo, lo cual hace pensar que la aplicación de estos microorganismos podría ser efectiva para la solubilización de P en estos suelos, sobre todo si se da un uso constante de los mismos en suelos agrícolas.

Lo anterior se refuerza con los datos aportados por Marín (2015), en un estudio realizado en papa en un Andisol de la zona de Zarcero con manejo convencional (esto es, con altas fertilizaciones químicas y un contenido de P en solución de 376mg.L<sup>-1</sup>) y manejo orgánico (con fertilizaciones orgánicas y un contenido de P en solución de 50mg.L<sup>-1</sup>), donde se obtuvo un efecto mayor en el rendimiento de la papa con la adición de microorganismos solubilizadores de P, cuando estos se aplicaron al suelo con manejo convencional, con altas aplicaciones de P.

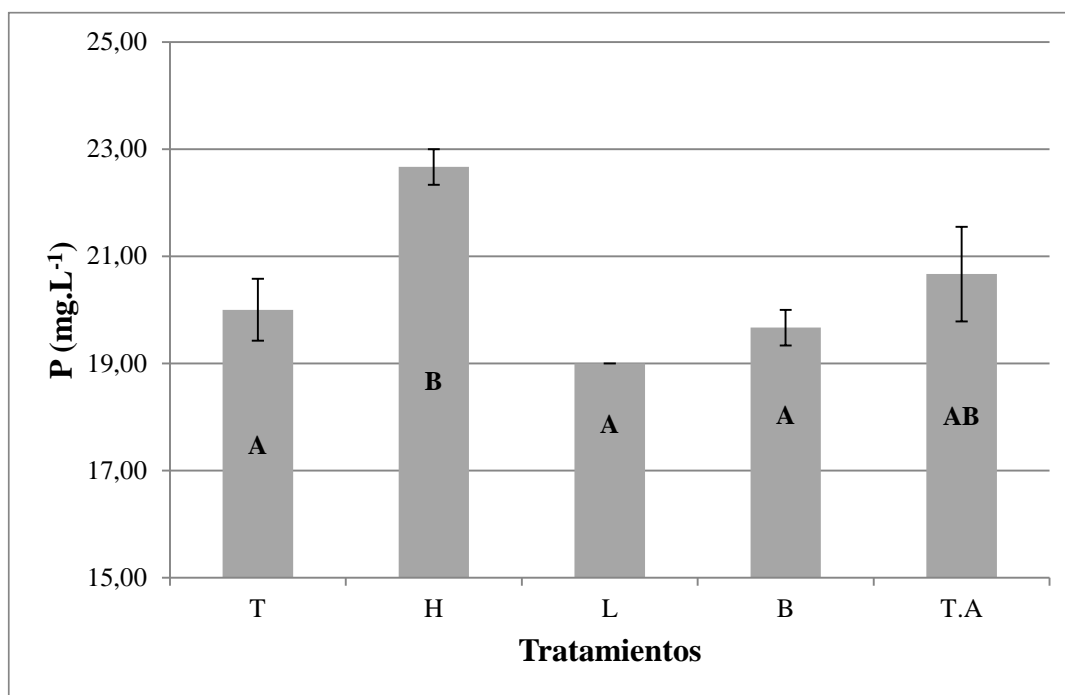


Figura 29. Fósforo en solución presente en los suelos 3 meses después de la cosecha de las plantas de arroz, según el microorganismo presente. San Pedro, San José. 2015. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cada columna.

Marín (2015), además menciona que las diferencias significativas por el uso de solubilizadores en el suelo con manejo convencional se reflejan en rendimiento de peso fresco de tubérculos, y en el caso del suelo con manejo orgánico el efecto no se refleja en el rendimiento, sino que se expresó a nivel de la densidad de raíces.

Se concluye que la metodología utilizada para la evaluación de las cepas a nivel de invernadero, es apropiada para la identificación de microorganismos potenciales solubilizadores de P en Andisoles bajo las condiciones más extremas (suelo Andisol proveniente del piso altitudinal medio y nula aplicación de fertilizantes o roca fosfórica). Los microorganismos así seleccionados podrán ser evaluados posteriormente en estos suelos ya sea para mejorar el aprovechamiento de la aplicación de fertilizantes fosfóricos o del fósforo presente en suelos con mayores cantidades de fósforo adsorbido (altas fertilizaciones fosfóricas previas) donde las fuerzas de retención del elemento en el mineral sean menores y por lo tanto la liberación del elemento se facilite, abriendo la posibilidad de utilizar estos microorganismos para hacer disponible el fósforo fijado.

## CONCLUSIONES

- Por medio de la metodología propuesta se lograron identificar de la zona elegida 29 cepas de microorganismos con capacidad para solubilizar P bajo condiciones in vitro.
- La inoculación al suelo del hongo, bacteria y levadura elegidos en las pruebas in vitro, generaron diferencias significativas en el crecimiento y desarrollo de las raíces en las plantas de arroz, no así en el follaje.
- Los microorganismos *Aspergillus flavus* y *Azospirillum oryzae*, fueron los que generaron una mejor respuesta en el desarrollo radical de las plantas de arroz (mayores pesos secos y mayores índices raíz/tallo, menores longitudes de raíz principal y menores densidades radicales).
- No se generaron diferencias significativas en los contenidos de P foliar entre tratamientos. Esto pudo ser debido a que la solubilización de P por parte de los microorganismos en este suelo no fue suficiente para un eficiente intercambio catiónico en la raíz y la consecuente absorción del mineral por parte de la planta.
- *Aspergillus flavus* presentó una mejor sobrevivencia en el suelo después de la cosecha. Además este hongo y *Azospirillum oryzae* presentaron la mayor solubilización de P en el suelo después de la cosecha.
- En suelos agrícolas donde la fracción de P adsorbido o no disponible para la planta es muy alta, como es el caso de los Andisoles, la inoculación de microorganismos solubilizadores de P podría favorecer la desorción de este elemento, haciéndolo disponible para la planta.

## RECOMENDACIONES

- Luego de una primera selección de manera in vitro, es recomendable evaluar los microorganismos en condiciones de suelo de diferente mineralogía, mayores contenidos de P total o aplicación de fertilización fosfórica, con el objetivo de evaluar la efectividad de los mismos en aumentar la eficiencia de la absorción de P por parte de las plantas.
- Para los siguientes ensayos a realizar en invernadero, se recomienda la aplicación de algún tipo de fertilización nitrogenada, ya que al parecer *Azospirillum oryzae* no generó un cambio en los contenidos de nitrógeno de las plantas inoculadas y queda la duda de si al aplicar nitrógeno se podría forzar la solubilización o la absorción de P por parte de la planta, al no presentarse el N como nutriente limitante en el desarrollo normal de las plantas.
- También podría probarse la inoculación de los microorganismos antes de la siembra y durante el ciclo de cultivo, con el objetivo de probar si se presenta la solubilización de fósforo en cantidades más altas y la planta logra absorber en mayor cantidad este elemento.

## LITERATURA CONSULTADA

- ABD-ALLA, M. 1994. Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Viceae* phosphatases. *Biology and Fertility of soil*. 18:216-218
- ABDÚ, N. 2006. Soil phosphorus extraction methodologies: A review. *African Journal of Agricultural Research*. 1(5): 159-161.
- ABOU NOHRA, J; MADRAMOOTOO, J; HENDERSHOT, W. 2007. Modelling phosphate adsorption to the soil: Application of the non-ideal competitive adsorption model. *Environmental Pollution*, London. 149: 1-9.
- ALAM, S., S. KHALIL, N. AYUB, AND M. RASHID. 2002. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Int. J. Agr. Biol.* 4: 454-458.
- ALARCÓN, A; FERRERA- CERRATO , R. 2000. Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica en México*, 26(2): 191-203.
- ALVARADO A., BERTSCH F., BORNEMISZA E., CABALCETA G., FORSYTHE W., HENRÍQUEZ C., MATA R.A., MOLINA E., SALAS R. 2001. Suelos derivados de cenizas volcánicas (Andisoles) de Costa Rica. ACCS. San José, Costa Rica. 112 p.
- ALVARADO, A; ITURRIAGA, I; SMYTH, J; PORTUGUEZ, E; UREÑA, J. 2009. Efecto residual del fertilizante fosfatado adicionado al cultivo de la papa en un Andisol de Juan Viñas, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 33(1): 63-76
- ASEA, P; KUCEY, R; STEWART, J. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol Biochem* 20:459-464
- AWASTHI, R; TEWARI, R; NAYYAR, H. 2011. Synergy between Plants and P-Solubilizing Microbes in soils: Effects on Growth and Physiology of Crops. *International Research Journal of Microbiology*. 2(12): 484-503.
- BAR-YOSEF, B; ROGERS, J; WOLFRAM, J; RICHMAN, E. 1999. *Pseudomonas cepacia*- mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. *Soil Science Society of America Journal*, 63:1703-1708.

- BARROSO, C. B., AND E. NAHAS. 2005. The status of soil fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Appl. Soil. Ecol.* 29: 73-83.
- BECERRA, J; QUINTERO, D; MARTÍNEZ, M; MATIZ, A. 2011. Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. Vol. 5(2): 195-208.
- BERNAL, L. 2010. Aislamiento de microorganismos solubilizadores de P (PSM) de las raíces de Vainilla sp. Tesis Lic. Bogotá, CO. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Microbiología. 30p.
- BERTSCH F. 1982. Fertilidad de nueve suelos clasificados como Typic Dystrandept en costa Rica. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 122 p.
- BERTSCH, F. 1995. La fertilidad de los suelos y su manejo. 1ª ed. San José, CR. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. 157p.
- BOBADILLA, C; RINCÓN, S. 2008. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Tesis Lic. Bogotá, CO. Pontificia Universidad Javeriana. 87p.
- CABALCETA, G. 1993. Niveles críticos de fósforo, azufre y correlación de soluciones extractoras en Ultisoles, Inceptisoles, Vertisoles y Andisoles de Costa Rica. Tesis de Maestría en Recursos Naturales. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 167p.
- CAKMAK, I., WELCH, R. M., ERENOGLU, B., RÖMHELD, V., NORVELL, W. A. AND KOCHIAN, L. V. 2000. Influence of varied zinc supply on re-translocation of cadmium (<sup>109</sup>Cd) and rubidium (<sup>86</sup>Rb) applied on mature leaf of durum wheat seedlings. *Plant Soil* 219, 279–284.
- CAMPO, J. 2010. Identifican bacterias para producir fertilizantes limpios (en línea). UN Periódico. Bogotá, CO. Consultado el 6 de febrero, 2014. Disponible en: <http://www.unperiodico.unal.edu.co/dper/article/identifican-bacterias-para-producir-fertilizantes-limpios.html>



- CANESSA J., SANCHO F., ALVARADO A. 1986. Retención de fosfatos en Andepts de Costa Rica. I. Relaciones entre la retención de fosfatos, el pH en NaF y el aluminio activo. *Turrialba* 36(4):431-438.
- CANESSA J., SANCHO F., ALVARADO A. 1987. Retención de fosfatos en Andepts de Costa Rica. II. Respuesta a la fertilización fosfórica. *Turrialba* 37(2):211-218.
- CARLILE, M. J., S. C. WATKINSON, AND G. W. GOODAY. 2001. *The Fungi*. Academic Press, Great Britain. 588 p.
- CASTRO L., MURILLO M. URIBE L., MATA R. 2015. Inoculación al suelo con *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum oryzae*, *Bacillus subtilis* y microorganismos de montaña (MM) y su efecto sobre un sistema de rotación soya-tomate bajo condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense* 39(3):21-36.
- CEPEDA, M; GAMBOA, A; VALENCIA, H; LOZANO, A. 2005. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia: Hongos solubilizadores de fosfatos minerales aislados de la rizósfera de *Espeletia grandiflora* del páramo El Granizo. Bonilla, M. Bogotá, CO. Universidad Nacional de Colombia. 356p.
- CERÓN, L.; MELGAREJO, L. 2005. Enzimas del suelo: indicadores biológicos de salud y calidad. *Acta biológica colombiana* 10(1):5-18
- CHUN-CHAO, C; YU-LIN, K; CHEN-CHING, C y WEI-LIANG, C. 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biol. Fertil. Soils* 43: 575-584.
- CONGRESO NACIONAL AGRONÓMICO Y CONGRESO NACIONAL DE SUELOS. (XI / III. 1999. San José, CR). 1999. Fertilización del cultivo del arroz (*Oryza sativa*). Rodríguez, J. FERTICA. 123-136.
- CORDERO, J; ORTEGA, P; ORTEGA, E. 2008. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp. incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10(1): 111-121.
- CRACOGNA, M; IGLESIAS, M; DIAZ, I; GONZÁLES, N; CARBAJAL, M. 2003. Utilización de *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fósforo en el cultivo de trigo (en línea). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, AR. Consultado el: 19 de noviembre, 2013. Disponible en:

<http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/05-Agrarias/A-045.pdf>

- DARMWAL, N; SINGH, R; y RAI, R. 1989. Isolation of phosphate solubilizers from different sources. *Current Science* **58**, 570-1.
- DIGHTON, J. 2007. Nutrient cycling by saprotrophic fungi in terrestrial habitats. *In*: Kubicek, C. P., and I. S. Druzhinina (eds). *Environmental and Microbial Relationships*. Second edition. The Mycota. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp: 287-300.
- DO CARMO HARTA, M; TORRENT, J. 2007. Phosphorus desorption kinetics in relation to phosphorus forms and sorption properties of Portuguese acid soils. *Soil Sci.* 172: 631-638.
- DUTTA, S. AND PODILE, A. R. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Crit. Rev. Microbiol.* 36, 232–244.
- ECHEVERRÍA, E. 2012. Efecto de la interacción de hongos micorrícicos arbusculares y *Pseudomonas fluorescens* sobre el desarrollo y la nutrición de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) durante las primeras fases de crecimiento. Tesis Lic. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. 92p.
- EIVAZI, F.; TAHATAHAI, M. 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biol Biochem* 9: 167-172.
- FALLAS, R. 2013. Avaliação e calibração de extratores de fósforo em três diferentes ordens de solo da Costa Rica. Dissertação (Mestrado). Piracicaba-SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo. 100 p.
- FASSBENDER H. 1966. La adsorción de fosfatos en suelos fuertemente ácidos y su evaluación usando la isoterma de Langmuir. *Fitotecnia Latinoamericana* 3(1/2):203-198.
- FÖHSE, D; CLAASSEN, N; JUNGK, A. 1991. Phosphorus efficiency of plants II. Significance of root radius, root hairs and cation/anion balance for phosphorus influx in seven plant species. *Plant Soil* 132:261–272
- FOEHSE, D., JUNGK, A. 1983. Influence of phosphate and nitrate supply on root hair formation of rape, spinach and tomato plants. *Plant and Soil* 74, 359e368.
- FROSSARD, E; CONDRON, L; OBERSON, A; SINAJ, S; FARDEAU, J. 2000. Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *J. Environ. Qual.* 29:15-23.

- GAHOONIA, T; NIELSEN, N. 1992. The effect of root induced pH changes on the depletion of inorganic and organic phosphorus in the rhizosphere. *Plant Soil* 143:185–191.
- GAHOONIA, T; NIELSEN, N; JOSHI, P; JAHOOR, A. 2001. A root hairless barley mutant for elucidating genetics of root hairs and phosphorus uptake. *Plant and Soil*. 235: 211-219.
- GAUR, A; MATHUR, R; SADASIVAM, K. 1980. Effect of organic materials and phosphate-dissolving culture on the yield of wheat and greengram. *Indian Journal of Agronomy*. **25**, 501{3.
- GERKE J. 1993. Solubilization of Fe (III) from humic-Fe complexes, humic Fe oxide mixtures and from poorly ordered Fe-oxide by organic acids: consequences for Padsorption. *Z Pflanz Bodenkunde* 156:253–257
- GLICK, B. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian J. Microbiol.* 41:109-117.
- GOLDSTEIN, A. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*. 12: 185-193.
- GÓMEZ, R; BELLO, D; PRADA, L; RODRÍGUEZ, M; GÓMEZ, L; FRANCO, M. 2011. Actinomicetes mineralizadores de fosfato involucrados en la interacción radical de *Glomus* sp.-trébol blanco. *Agronomía Mesoamericana*. 22(2): 317-327.
- GÓMEZ-GUIÑÁN, Y y ZABALA, M. 2001. Determinación de la capacidad solubilizadora del P en hongos aislados de la rizósfera del maní (*Arachis hypogea* L.). *Saber* 13: 8-13.
- GUPTA, R; SINGAL, R; SHANKAR, A; KUHAD, R; SAXENA, R. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology*. 40: 255-260.
- GYANESHWAR, P; PAREKH, L; ARCHANA, G; POOLE, P; COLLINS, M; HUTSON, R; NARESH, K. 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter absuriae*. *FEMS Microbiology Letters*. 171: 223-229.

- GYANESHWAR, P; NARESH KUMARG; PAREKH, LJ; POOLE, PS. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245:83–93
- HARRIS, P. 1992. Ecología de la población del suelo. En: *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell*. E. J. Russell, A. Wild (Eds). Mundi-Prensa Libros, España. 1045 p.
- HAYES JE, SIMPSON RJ, RICHARDSON AE. 2000. The growth and phosphorus utilization of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant Soil*. 220:165–174
- HAYES, J; RICHARDSON, A; SIMPSON, R. 1999. Phytase and acid phosphatase activities in extracts from roots of temperate pasture grass and legume seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.* 26, 801–809.
- HE, ZL; BIAN, W; ZHU, J. 2002. Screening and identification of microorganisms capable of utilizing phosphate absorbed by goethite. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 33: 647-663.
- HENRÍQUEZ, C; BRICEÑO-SALAZAR, J; MOLINA, E. 1992. Fraccionamiento de fósforo orgánico en cuatro órdenes de suelo de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 16(2): 31-38.
- HENRÍQUEZ C. 2005. Sorción y desorción de fósforo en un andisol de Costa Rica dedicado al cultivo del café, caña de azúcar y bosque. *Agronomía Costarricense* 29(3):97-105.
- HERNÁNDEZ, T; CARRIÓN, G; HEREDIA, G. 2011. Solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia* 45: 881-892.
- HINSINGER, P; GILKES, R. 1996. Mobilization of phosphate from phosphate rock and alumina-sorbed phosphate by the roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. *Euro JSoil Sci* 47:533–544
- HINSINGER, P. 2001. Bioavailability of inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. *Plant Soil* 237:173–195
- HÜBEL, F; BECK, E. 1996. Maize root phytase. Purification, characterization and localization of enzyme activity and its putative substrate. *Plant Physiol.* 112, 1429–1436.

- HWANGBO, H; PARK, Y; KIM, W; RIM, Y; PARK, K; KIM, T; SUH, J; KIM, K. 2003. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedius*. *Curr. Microbiol.* 47: 87–92.
- ILLMER, P; SCHINNER, F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol Biochem* 27:257–263
- INIFAP. 2012. Introducción al uso y manejo de los biofertilizantes en la agricultura. Aguado, G. Guanajuato, MX. CIRCE-INIFAP. 315p.
- JOINT GENOME INSTITUTE, MYCOCOSM. 2016. *Wickerhamomyces anomalus* NRRL Y-366-8 v1.0 (en línea). United States Department of Energy. California, USA. Consultado el: 2 de febrero, 2016. Disponible en: <http://genome.jgi.doe.gov/Wican1/Wican1.home.html>
- JONES, D; SMITH, M; WILSON, J y GOODMAN, B.1991. Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. *Mycol. Res.* 95: 1090-1093.
- JUNGK, A. 2001. Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *J Plant Nutr Soil Sci* 164:121–129
- KEPERT, D; ROBSON, A; POSNER, A. 1979. The effect of organic root products on the availability of phosphorus to plants In: *The Soil-root interface: (L. Harley and R. Scott Rusell Eds.) Academic Press London.* Pp: 115-124
- KHAN, M; ZAIDI, A; WANI, P. 2007. Role of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture. *Sustainable Agriculture* no. 27:551-570
- KIM, K; JORDAN, D; MCDONALD, A. 1997. Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and fertility of soils*, 26:79-87
- KUCEY, R. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can J Soil Sci* 63:671–678
- KUCEY, R. 1987. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilising *Penicillium bilaji* strain and with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Environmental Microbiology.* 53, 2699{703.
- KUCEY, R. 1988. Efect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. *Canadian Journal of Soil Science* 68, 261{70.

- KUCEY, R; JANZEN, H; LEGGETT, M. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv Agron* 42:199–228
- LI, M; OSAKI, M; RAO, I; TADANO, T. 1997. Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions. *Plant Soil* 195, 161–169.
- LIU, J. Q., SAMAC, D. A., BUCCIARELLI, B., ALLAN, D. L. AND VANCE, C. P. 2005. Signaling of phosphorus deficiency-induced gene expression in white lupin requires sugar and phloem transport. *Plant J.* 41, 257–268.
- LÓPEZ, M; MARTÍNEZ, R; BROSSARD, M; BOLÍVAR, A; ALFONSO, N; ALBA, A; PEREIRA, H. 2008. Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes venezolanos. *Agronomía Tropical.* 58(4): 391-401.
- LUGTENBERG, B. J. J., DE WEGER, L. A. AND BENNET, J. W. 1991. Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. *Current Opinions in Biotechnology* 2, 457–464.
- LYNCH J, MARSCHNER P, RENGEL Z. 2012. Chapter 13 - Effect of Internal and External Factors on Root Growth and Development, In Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Marschner P, editor). Academic Press, San Diego USA. pp 331-346.
- MALCOLM, R.. 1983. Assessment of Phosphatase activity in soils. *Soil Biol Biochem* 14(4): 403-408.
- MARÍN, S. 2015. Comparación de un Andisol manejado convencional y orgánicamente mediante la respuesta de la papa en invernadero a prácticas de fertilización convencional, orgánica y de aplicación de solubilizadores de fósforo. Tesis Lic.Ing.Agr. San José, CR. UCR. 61p.
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2<sup>da</sup> ed. London: Academic Press. 889p.
- MARTIN ,L; VELAZQUEZ, E; RIVAS, R; MATEOS, P; MARTINEZ-MOLINA, E; RODRIGUEZ-BARRUECO, C; PEIX, A. 2003. Effect of inoculation with a strain of *Pseudomonas fragi* on the growth and phosphorus content of strawberry plants, pp. 309–315. In: Velazquez E. & Rodriguez-Barrueco C. (eds), First International

- Meeting on Microbial Phosphate Solubilization (19–22 July 2002, Salamanca, Spain), Springer, The Netherlands.
- MARTÍNEZ-VIERA, R; LÓPEZ, B; DIBUT, A; PARRA, Z; RODRÍGUEZ, S. 2007. La fijación biológica de nitrógeno atmosférico en condiciones tropicales. Publicación especial del Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierra. 172 p.
- MARTINI, J. 1976. The evolution of soil properties as it releases to the genesis of volcanic soil ash in Costa Rica. *Soil Science Society of America Journal*. 40(6): 895-900.
- MATA R, ROSALES A, VÁSQUEZ A, SANDOVAL D. 2013. Mapa de Órdenes de Suelos de Costa Rica. 2a Ed. San José, Costa Rica. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. Esc 1: 200.000. Color
- MOTSARA, MR.; BHATTACHARYYA, P. y SRIVASTAVA, B. 1995. Biofertiliser Technology, Marketing and Usage. Fertiliser Development and Consultation Organisation. New Delhi, India. pp. 1, 2, 4-8, 12, 13, 57, 58.
- NAHAS, E. 2007. Phosphate solubilising microorganisms: Effect of carbon, nitrogen and phosphorus sources. In: Valázquez E, Rodríguez-Barrueco C (eds) First international meeting on microbial phosphate solubilization. *Developments in Plant and Soil Science*, vol 102. Springer, Dordrecht, 111–115p.
- NAKAMURA, Y; FUKUHARA, H; SANO, K. 2000. Secreted Phytase activities of Yeasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(4): 841-844.
- NAUTIYAL, C. 1999. An efficient microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS. Microbiology Letters*. 170:265-270.
- NEUMANN, G; RÖMHELD, V. 2007. The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) *The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, 2nd edition. CRC Press, New York. 23–72p.
- NIGUSSIE, D., SCHENK, M. K., CLAASSEN, N. AND STEINGROBE, B. 2003. Phosphorus efficiency of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*), carrot (*Daucus carota* L.), and potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Soil* 250, 215–224.
- NOVAIS, R; SMYTH, J; NUNES, F. 2007. Fósforo. In: *Fertilidade do solo*. Vicosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo. 79p.

- ÑÚSTEZ, C; ACEVEDO, J. 2005. Evaluación del uso de *Penicillium janthinellum* Biourge sobre la eficiencia de la fertilización fosfórica en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. var. Diacol Capiro). *Agronomía Colombiana*. 23(2): 290-298.
- OMAR, S. 1998. The role of rock phosphate solubilizing fungi and vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 211-219.
- OSORIO, N; HABTE, M. 2001. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and a P solubilizing fungus on growth and P uptake of *Leucaena leucocephala* in a Oxisol. *Arid Land Research and Management*. Vol. 15: 263-274.
- OSORIO, N; HABTE, M. 2013. Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphate-solubilizing fungus. *Biol Fertil Soils*. 49: 481-486.
- OSPINA O. 1974. El fósforo en Andosoles. pp. 99-136. In: H. Medina (ed). El fósforo en zonas tropicales, Tercer coloquio sobre suelos, Publicación de la Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. Suelos Ecuatoriales.
- PAUL, E; CLARK, F. 1996. *Soil microbiology and Biochemistry*. 2° ed. California, USA. Academic, Press. 340 p.
- PATEL, D. K.; ARCHANA, G. AND KUMAR, N. 2008. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. *Curr. Micro.*, 56: 168–174.
- PATIÑO, C. 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca: estudio de biodiversidad y eficiencia. Tesis Ph.D. Palmira, CO. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 133p.
- PELLNY, T., VAN AKEN, O., DUTILLEUL, C., WOLFF, T., GROTEN, K., BOR, M., DE PAEPE, R., REYSS, A., VAN BREUSEGEM, F., NOCTOR, G. AND FOYER, C. 2008. Mitochondrial respiratory pathways modulate nitrate sensing and nitrogen-dependent regulation of plant architecture in *Nicotiana sylvestris*. *Plant J.* 54, 976–992.
- PLAXTON, W; TRAN, H. 2011. Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiology*. Waterbury. 156: 1006-1015.
- PRADHAN, N., AND L. B. SUKLA. 2005. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 850-854.



- RAGHOTHAMA, K. 1999. Phosphate acquisition. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50: 665-693.
- RAMÍREZ, A; LÓPEZ, M; RUIZ, E; LATOURNERIE, L; PÉREZ, A; LOZANO, M; ZAVALA, M. 2014. Efectividad de inoculantes microbianos en el crecimiento y productividad de Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Agrocencia 48: 285-294.
- RASHID, M; KHALIL, S; AYUB, N; ALAM, S; LATIF, F. 2004. Organic acids production and Phosphate Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pakistan Journal of Biological Sciences. 7(2): 187-196.
- RICHARDSON, A; BAREA, J; MCNEILL, A; PRIGENT, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant soil (321):305-339.
- RICHARDSON, A; GEORGE, T; HENS, M; SIMPSON, R. 2005. Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. In: TURNER, B; FROSSARD, E; BALDWIN, D. (Ed). Organic Phosphorus in the Enviroment. London: CABI Publishing.8: 165-184.
- RICHARDSON, A. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availablility. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, Grace PR (eds) Management of the soil biota in sustainable farming systems. CSIRO Publishing, Melbourne. 50–62p.
- RICHARDSON, A; HADOBAS, P. 1997. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. Can. J. Microbiol. 43, 509–516.
- RODRÍGUEZ, H; FRAGO, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol Adv 17:319–339
- RODRIGUES, E. P., RODRIGUES, L. S., DE OLIVEIRA, A. L. M., BALDANI, V. L. D., TEIXEIRA, K. R., URQUIAGA, S. AND REIS, V. M. 2008. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 302, 249–261.
- ROOS, W; LUCKNER, M. 1984. Relationships between proton extursion and fluxes of ammonium ions and organicacids in *Penicillium cyclopium*. Journal of General Microbiology, 130: 1007-1014.

- SAITO, S Y GRACIOLLI, L. 1981. Relationships between *Azospirillum* spp. isolates from maize and sugar cane. En: Associative N<sub>2</sub>-Fixation. Volume II. Editado por: P. Vose y A. Ruschel. CRC Press. Florida, U.S.A. pp. 163-168.
- SALIH, H; YAHYA, A; ABDUL-RAHEM, A; MUNAM, B. 1989. Availability of phosphorous in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. *Plant Soil* 120, 181{5.
- SANZANO, A. 2013. El fósforo del suelo (en línea). Cátedra de Edafología. Tucumán , AR. Consultado el: 19 de noviembre, 2013. Disponible en: <http://www.edafo.com.ar/Descargas/Cartillas/Fosforo%20del%20Suelo.pdf>
- SCHACHTMAN, D; REID, R; AYLING, S. 1998. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant physiology*. 116: 447-453.
- SELVAKUMAR, G; JOSHI, P; NAZIM, S; MISHRA, P; BISHT, J; GUPTA, H. 2009. Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984), a psychrotolerant bacterium isolated from a high altitude Himalayan rhizosphere. *Biologia*. 64(2): 239—245.
- SHEN, J; YUAN, L; ZHANG, J; LI, H; BAI, Z; CHEN, X; ZHANG, W; ZHANG, F. 2011. Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology*. Vol. 156: 997–1005.
- SINSABAUGH, R; LAUBER, C; WEINTRAUB, M; AHMED, B; ALLISON, S; CRENSHAW, C; CONTOSTA, A; CUSACK, D; FREY, S; GALLO, M. 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology letters* 11(11):1252-1264.
- SMITH, F; MUDGE, S; RAE, A; GLASSOP, D. 2003. Phosphate transport in plants. *Plant and soil*. Dordrecht. 248: 71-83.
- SOTO J.A. 1998. Formas de fósforo y su liberación en Andisoles de la región central oriental de Costa Rica. Tesis Doctorado, Universidad de Córdoba. España. 155 p.
- SOUCHIE, E. L., R. AZCÓN, J. M. BAREA, O. J. SAGGIN-JÚNIOR, AND E. M. RIBEIRO-DA SILVA. 2006. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 41: 1405-1411.
- SPERBER, J. 1958. The incidence of apatite-solubilising organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research* 9, 778-81.

- SUBBA-RAO, N. 1982. Phosphate solubilization by soil microorganisms. In: Subba-Rao NS (ed) *Advances in agricultural microbiology*. Oxford and IBH Publishing, New Delhi. 295–303p.
- TADANO, T; OZAWA, K; SAKAI, H; OSAKI, M; MATSUI, H. 1993. Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorusdeficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots. *Plant Soil* 155(156): 95–98.
- TEJERA, B; HEYDRICH, M; ROJAS, M. 2013. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía mesoamericana*. 24(2):357-364.
- THE LATIN AMERICAN ALLIANCE. 1997. Los biofertilizantes en la agricultura cubana. <http://www.latinsynergy.org/microorganismoscuba2.htm>
- TICCONI, C; ABEL, S. 2004. Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *TRENDS in Plant Science*. Oxford. 9(11): 548-555.
- TINKER, P. 1980. The role of rhizosphere microorganisms in mediating phosphorus uptake by plants. In: Kwasenah FE, Sample EC, Kamprath EJ (eds) *The role of phosphorus in agriculture*. American Society of Agronomy, Madison, WI. 617–654p.
- VALENCIANO, A. 2014. Determinación de la actividad enzimática del suelo en tres fincas con diferente manejo agronómico en un Andisol, Cartago. Tesis Lic. Ing. Agr. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 104 p.
- VANCE, C; UHDE-STONE, C; ALLAN, D. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, Oak Rodge. 157: 423-447.
- VARGAS, S. 2012. Microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos. (Tesis Lic.). Bucaramanga, CO. Universidad Industrial de Santander. 69p.
- VENKATESWARLU, B; RAO, A; y RAINA, P. 1984. Evaluation of phosphorus solubilisation by microorganisms isolated from aridisols. *Journal of Indian Society of Soil Science* **32**, 273-7.
- VERA, D; PÉREZ, H; VALENCIA H. 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de Arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biológica Colombiana*. Vol. 7(1): 33-40.

- WAKELIN, S; ANSTIS, S; WARREN, R; RYDER, M. 2006. The role of pathogen suppression on the growth promotion of wheat by *Penicillium radicum*. Aust Plant Pathol 35:253–258.
- WHITELAW, M; HARDEN, T; BENDER, G. 1997. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov. Aust J Soil Res 35:291–300
- WHITELAW, M. 1999. Growth promoting of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. In: Sparks, D. L. (ed). Advanced in Agronomy 69. pp: 99-151.
- WHITELAW, M; HARDEN, T; HELAYER, K. 1999. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. Soil Biol Biochem 31:655–665
- WHITELAW, M. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. Adv Agron 69:99–151
- ZAADY, E. Y PEREVOLOTSKY, A. 1995. Enhancement of growth and establishment of oak seedlings (*Quercus ithaburensis* Decaisne) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. Forest Ecology and Management 72(1): 81-83.

## ANEXOS

### **Anexo 1. Medio utilizado en el laboratorio para el aislamiento de los microorganismos Solubilizadores de Fósforo (Osorio y Habte, 2001).**

Para un litro de medio de solubilizadores de fósforo, se necesita:

-1g de NaCl

-0,2g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O

-0,4g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

-1g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

-10g de Dextrosa

-15g de Agar

-3,5g de Roca fosfórica con un tamaño de partícula entre 90-500µm

-30mg de Verde de bromocresol

**Anexo 2. Análisis químico del suelo utilizado de la zona de Rancho Redondo para el ensayo en invernadero (antes de aplicar los tratamientos).**

**LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES  
 REPORTE DE ENSAYO**

SC12-LSF-I01-R01 (v7)

**Nº DE REPORTE: 51148**

USUARIO: PROYECTO SOLUBILIZADORES DE FOSFORO (LEIDA CASTRO)

RESPONSABLE: LEIDA CASTRO  
 CORREO leida.castro@ucr.ac.cr  
 TELÉFONO: 2511-2081

PROVINCIA: SAN JOSE  
 CANTÓN: GOICOECHEA  
 LOCALIDAD: RANCHO REDONDO  
 CULTIVO: SIN CULTIVO

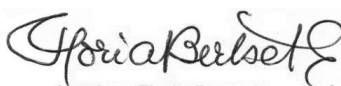
ANÁLISIS: QC  
 FECHA RECEPCIÓN: 21/07/2014  
 EMISIÓN DE REPORTE: 04/08/2014  
 Nº DE MUESTRAS TOTAL: 1  
 PÁGINA: 1/1

ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS													
Solución Extractora:		pH	cmol(+)/L					%	mg/L				
KCl-Olsen Modificado		H <sub>2</sub> O	ACIDEZ	Ca	Mg	K	CICE	SA	P	Zn	Cu	Fe	Mn
ID USUARIO	ID LAB	5,5	0,5	4	1	0,2	5		10	3	1	10	5
SUELO RANCHO REDONDO	S-14-07247	5,3	0,41	4,06	1,25	0,33	6,05	7	6	8,8	15	315	14

Los valores debajo de cada elemento corresponden con los Niveles Críticos generales para la solución extractora usada

CICE=Capacidad de intercambio de Cationes Efectiva=Acidez+Ca+Mg+K

SA=Porcentaje de Saturación de Acidez=(Acidez/CICE)\*100



Ing. Agr. Floria Bertsch

COORDINADORA, LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES

1. Las unidades están expresadas en base seca, en m/v. 2. Procedimiento: pH en agua 10:25; Acidez, Al, Ca y Mg con KCl 1M 1:10; P, K, Zn, Fe, Mn y Cu con Olsen Modificado pH 8,5 (NaHCO<sub>3</sub> 0,5 N, EDTA 0.01M, Superfloc 127) 1:10; S con Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0,008M 10:25. Acidez determinada por valoración con NaOH y Al con HCl; P y S por Colorimetría con el Analizador de Inyección de Flujo (FIA) y el resto de los elementos por Espectrofotometría de Absorción Atómica. C y N totales por combustión seca en Autoanalizador y Conductividad Eléctrica (CE) en agua en relación 1:1. 3. El muestreo es responsabilidad del usuario. 4. Los resultados se refieren únicamente a las muestras ensayadas. 5. El tiempo de custodia de las muestras es de 45 días a partir del ingreso de la muestra. 6. El Reporte de Ensayo válido es el original firmado y sellado que se imprime a solicitud expresa del usuario; cuando el usuario solicita el envío del reporte por correo electrónico o fax libera al Laboratorio de resguardar la integridad y confidencialidad de sus resultados.

**Anexo 3. Análisis químico del suelo de Rancho Redondo para determinar la cantidad del P total en el mismo (antes de aplicar los tratamientos).**

**LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES  
REPORTE DE ENSAYO**

SC12-LSF-I01-R01 (v7)

**Nº DE REPORTE: 51149**

USUARIO: PROYECTO SOLUBILIZADORES DE FOSFORO (LEIDA CASTRO)

RESPONSABLE: LEIDA CASTRO

CORREO leida.castro@ucr.ac.cr

TELÉFONO: 2511-2081

PROVINCIA: SAN JOSE

CANTÓN: GOICOECHEA

LOCALIDAD: RANCHO REDONDO

CULTIVO: SIN CULTIVO

ANÁLISIS: P

FECHA RECEPCIÓN: 21/07/2014

EMISIÓN DE REPORTE: 06/08/2014

Nº DE MUESTRAS TOTAL: 1

PÁGINA: 1/1

ANÁLISIS QUÍMICO DE ABONOS ORGÁNICOS		
ID USUARIO	IDLAB	%
		P
SOL: SUELO RANCHO REDONDO	AO-14-00232	0,09

900 ppm

Ing.Agr. Floria Bertsch

COORDINADORA, LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES

1. Las unidades están expresadas en base seca, en m/m. 2. Procedimiento: en sólidos, N por combustión seca en Autoanalizador de acuerdo al SC09-LSF-01-P06; y en líquidos por digestión húmeda; P, Ca, Mg, K, S, Na, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Al por digestión húmeda con HNO<sub>3</sub> y determinación por Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma (ICP) de acuerdo al SC09-LSF-01-P10. 3. El muestreo es responsabilidad del usuario. 4. Los resultados se refieren únicamente a las muestras ensayadas. 5. El tiempo de custodia de las muestras es de 45 días a partir del ingreso de la muestra. 6. El Reporte de Ensayo válido es el original firmado y sellado que se imprime a solicitud expresa del usuario; cuando el usuario solicita el envío del reporte por correo electrónico o fax libera al Laboratorio de resguardar la integridad y confidencialidad de sus resultados.

**Anexo 4. Análisis químico del suelo de Rancho Redondo para determinar la relación Carbono/Nitrógeno en el mismo (antes de aplicar los tratamientos).**



**CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS  
LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES  
REPORTE DE ENSAYO**

SC12-LSF-I01-R01 (v9)

**Nº DE REPORTE: 55349**

USUARIO: PROYECTO SOLUBILIZADORES DE FOSFORO (LEIDA CASTRO)

RESPONSABLE: LEIDA CASTRO  
CORREO: leida.castro@ucr.ac.cr / paov\_78@yahoo.es  
TELÉFONO: 2511-2081

PROVINCIA: SAN JOSE  
CANTÓN: GOICOECHEA  
LOCALIDAD: LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA  
CULTIVO: SIN CULTIVO

ANÁLISIS: CT,NT,C/N  
FECHA RECEPCIÓN: 03/09/2015  
EMISIÓN DE REPORTE: 11/09/2015  
Nº DE MUESTRAS TOTAL: 1  
PÁGINA: 1/1

ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS				
ID USUARIO	ID LAB	%		Relación
		C	N	C/N
SUELO RANCHO REDONDO	S-15-09047	3,00	0,31	9,7

OBSERVACIÓN: El % C y N totales se determinaron con el Autoanalizador de C/N por combustión seca. Los valores de % C total correlacionan muy bien ( $R2 \geq 0,95$ ) con el % de MO. Si quiere estimar el valor del % MO a partir del dato de % C total determinado con esta metodología, multiplique el % C total por 1,43.

**Floria Bertsch H.**  
COORDINADORA

**Mariana Blanco M.**  
N.I. 2468

1. El muestreo es responsabilidad del usuario. 2. Los resultados se refieren únicamente a las muestras ensayadas. 3. El tiempo de custodia de las muestras es de 45 días a partir del ingreso de la muestra. 4. El Reporte de Ensayo válido es el original firmado y sellado que se imprime a solicitud expresa del usuario; cuando el usuario solicita el envío del reporte por correo electrónico o fax libera al Laboratorio de resguardar la integridad y confidencialidad de sus resultados.



**Anexo 5. Resultados de laboratorio para solubilización de P por medio de bacterias y levaduras en medio in vitro.**

**LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES  
REPORTE DE ENSAYO**

**Nº DE REPORTE: 52612**

USUARIO: PROYECTO SOLUBILIZADORES DE FOSFORO(LEIDA CASTRO)

RESPONSABLE: LEIDA CASTRO

CORREO: leida.castro@ucr.ac.cr

TELEFONO: 2511-2081

PROVINCIA: SAN JOSE

CANTÓN: GOICOECHEA

LOCALIDAD: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

CULTIVO: AGUAS

ANÁLISIS: P

FECHA RECEPCIÓN: 03/12/2014

EMISIÓN DE REPORTE: 08/12/2014

Nº DE MUESTRAS TOTAL: 15

PÁGINA: 1/1

<b>ANÁLISIS QUÍMICO DE AGUAS</b>		
		mg/L
<b>ID USUARIO</b>	<b>IDLAB</b>	<b>P</b>
8-1	A-14-322	11,2
8-2	A-14-323	18,9
8-3	A-14-324	13,5
9-1	A-14-325	14,9
9-2	A-14-326	23,3
9-3	A-14-327	14,0
22-1	A-14-328	7,6
22-2	A-14-329	6,3
22-3	A-14-330	8,9
11-1	A-14-331	9,3
11-2	A-14-332	9,9
11-3	A-14-333	13,3
T-1	A-14-334	1,3
T-2	A-14-335	1,4
T-3	A-14-336	0,4

Ing. Agr. Floria Bertsch

COORDINADORA, LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES

**LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES  
REPORTE DE ENSAYO**

**Nº DE REPORTE: 52715**

USUARIO: PROYECTO SOLUBILIZADORES DE FOSFORO(LEIDA CASTRO)

RESPONSABLE: PAOLA VARGAS

CORREO: leida.castro@ucr.ac.cr

TELEFONO: 2511-2081

PROVINCIA: SAN JOSE

CANTÓN: GOICOECHEA

LOCALIDAD: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

CULTIVO: AGUAS

ANÁLISIS:

P

FECHA RECEPCIÓN: 10/12/2014

EMISIÓN DE REPORTE: 15/12/2014

Nº DE MUESTRAS TOTAL: 12

PÁGINA: 1/1

<b>ANÁLISIS QUÍMICO DE AGUAS</b>		
		mg/L
<b>ID USUARIO</b>	<b>IDLAB</b>	<b>P</b>
50-1	A-14-352	3,6
50-2	A-14-353	3,7
50-3	A-14-354	4,1
51-1	A-14-355	10,3
51-2	A-14-356	8,3
51-3	A-14-357	8,4
21-1	A-14-358	9,1
21-2	A-14-359	5,4
21-3	A-14-360	6,4
TESTIGO 1	A-14-361	1,5
TESTIGO 2	A-14-362	1,5
TESTIGO 3	A-14-363	1,0

Ing. Agr. Flavia Bertsch

COORDINADORA, LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES

**LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES  
 REPORTE DE ENSAYO**

**Nº DE REPORTE: 52954**

USUARIO: PROYECTO SOLUBILIZADORES DE FOSFORO(LEIDA CASTRO)

RESPONSABLE: PAOLA VARGAS

CORREO: leida.castro@ucr.ac.cr

TELEFONO: 2511-2081

PROVINCIA: SAN JOSE

CANTÓN: GOICOECHEA

LOCALIDAD: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

CULTIVO: AGUA

ANÁLISIS: P

FECHA RECEPCIÓN: 22/01/2015

EMISIÓN DE REPORTE: 26/01/2015

Nº DE MUESTRAS TOTAL: 15

PÁGINA: 1/1

<b>ANÁLISIS QUÍMICO DE AGUAS</b>		
		mg/L
ID USUARIO	IDLAB	P
T1	A-15-012	3,5
T2	A-15-013	1,8
T3	A-15-014	2,2
18-1	A-15-015	2,6
18-2	A-15-016	1,9
18-3	A-15-017	2,1
19-1	A-15-018	3,2
19-2	A-15-019	4,5
19-3	A-15-020	3,8
52-1	A-15-021	2,3
52-2	A-15-022	2,2
52-3	A-15-023	2,7
55-1	A-15-024	2,8
55-2	A-15-025	2,9
55-3	A-15-026	2,3



Ing. Agr. Floria Bertsch

COORDINADORA, LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES

**Anexo 6. Análisis químico foliar de plantas de arroz var. Palmar 18, utilizadas como cultivo indicador en el ensayo en invernadero para probar microorganismos solubilizadores de P.**



**LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES  
 REPORTE DE ENSAYO  
 SC12-LSF-I01-R01 (v8)**



**Nº DE REPORTE: 54741**

USUARIO: PROYECTO SOLUBILIZADORES DE FOSFORO (LEIDA CASTRO)  
 SUBCLIENTE: TESIS PAOLA VARGAS  
 RESPONSABLE: PAOLA VARGAS  
 CORREO: leida.castro@ucr.ac.cr / paov\_78@yahoo.es  
 TELÉFONO: 2511-2081

ANÁLISIS: QC,B,S  
 FECHA RECEPCIÓN: 10/07/2015  
 EMISIÓN DE REPORTE 17/07/2015  
 Nº DE MUESTRAS TOTAL 30  
 PÁGINA: 1/2

PROVINCIA: SAN JOSE  
 CANTÓN: MONTES DE OCA  
 LOCALIDAD: INVERNADERO  
 CULTIVO: ARROZ

ANÁLISIS QUÍMICO FOLIAR												
ID USUARIO	ID LAB	% <sup>1</sup>						mg/kg				
		N	P	Ca	Mg	K	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
TESTIGO 1	P-15-05743	0,99	0,15	0,28	0,17	2,16	0,15	57	4	45	580	7
TESTIGO 2	P-15-05744	1,12	0,15	0,31	0,19	2,25	0,17	55	5	52	567	8
TESTIGO 3	P-15-05745	1,10	0,12	0,40	0,23	2,29	0,17	88	5	62	601	9
TESTIGO 4	P-15-05746	1,04	0,14	0,35	0,19	2,21	0,19	68	5	53	758	8
LEVADURA + AZO 1	P-15-05747	1,20	0,15	0,29	0,20	2,37	0,15	55	5	54	547	8
LEVADURA + AZO 2	P-15-05748	1,11	0,14	0,30	0,17	2,28	0,14	50	5	44	611	8
LEVADURA + AZO 3	P-15-05749	1,20	0,13	0,43	0,21	2,52	0,18	65	5	56	514	11
LEVADURA + AZO 4	P-15-05750	1,09	0,13	0,28	0,17	2,09	0,15	47	5	57	599	7
HONGO 1	P-15-05751	1,02	0,15	0,30	0,18	2,19	0,15	61	5	40	737	7
HONGO 2	P-15-05752	1,22	0,14	0,29	0,20	2,28	0,16	68	5	50	471	6
HONGO 3	P-15-05753	1,02	0,14	0,30	0,19	2,20	0,15	54	5	52	663	7
HONGO 4	P-15-05754	1,21	0,16	0,31	0,21	2,58	0,20	67	6	56	490	6
HONGO + AZO 1	P-15-05755	1,03	0,13	0,29	0,21	2,29	0,17	49	4	59	514	8
HONGO + AZO 2	P-15-05756	1,03	0,13	0,29	0,18	2,20	0,15	56	4	54	505	9
HONGO + AZO 3	P-15-05757	1,11	0,15	0,29	0,19	2,46	0,17	50	5	60	414	7

OBSERVACIÓN: MUESTRAS SECAS.

**Floria Bertsch H.**  
 COORDINADORA

**Marianela Blanco M.**  
 N.I. 2468

1. Las unidades están expresadas en base seca, en m/m. 2. Procedimiento: N por combustión seca en Autoanализador de acuerdo al SC09-LSF-01-P06; P, Ca, Mg, K, S, Na, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Al por digestión húmeda con HNO<sub>3</sub> y determinación por Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma (ICP) de acuerdo al SC09-LSF-01-P10. 3. El muestreo es responsabilidad del usuario. 4. Los resultados se refieren únicamente a las muestras ensayadas. 5. El tiempo de custodia de las muestras es de 45 días a partir del ingreso de la muestra. 6. El Reporte de Ensayo válido es el original firmado y sellado que se imprime a solicitud expresa del usuario; cuando el usuario solicita el envío del reporte por correo electrónico o fax libera al Laboratorio de resguardar la integridad y confidencialidad de sus resultados.



**LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES**  
**REPORTE DE ENSAYO**  
 SC12-LSF-I01-R01 (v8)



**Nº DE REPORTE: 54742**

USUARIO: PROYECTO SOLUBILIZADORES DE FOSFORO (LEIDA CASTRO)  
 SUBCLIENTE: TESIS PAOLA VARGAS  
 RESPONSABLE: PAOLA VARGAS  
 CORREO: leida.castro@ucr.ac.cr / paov\_78@yahoo.es  
 TELÉFONO: 2511-2081

ANÁLISIS: QC,B,S  
 FECHA RECEPCIÓN: 10/07/2015  
 EMISIÓN DE REPORTE 17/07/2015  
 Nº DE MUESTRAS TOTAL 6  
 PÁGINA: 1/1

PROVINCIA: SAN JOSE  
 CANTÓN: GOICOECHEA  
 LOCALIDAD: INVERNADERO  
 CULTIVO: ARROZ

ANÁLISIS QUÍMICO FOLIAR												
ID USUARIO	ID LAB	%						mg/kg				
		N	P	Ca	Mg	K	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
TESTIGO AZO 3	P-15-05773	1,02	0,14	0,32	0,19	2,30	0,16	61	5	51	726	9
TESTIGO AZO 4	P-15-05774	1,24	0,17	0,32	0,20	2,44	0,18	55	6	64	655	8
LEVADURA 1	P-15-05775	0,99	0,15	0,26	0,17	2,13	0,14	41	5	47	524	7
LEVADURA 2	P-15-05776	1,09	0,14	0,32	0,21	2,37	0,16	67	5	55	565	8
LEVADURA 3	P-15-05777	1,08	0,16	0,30	0,23	2,44	0,17	88	6	58	694	8
LEVADURA 4	P-15-05778	1,06	0,16	0,30	0,18	2,34	0,17	57	5	51	713	8

**Floria Bertsch H.**  
 COORDINADORA

**Marianela Blanco M.**  
 N.I. 2468

1. Las unidades están expresadas en base seca, en m/m. 2. Procedimiento: N por combustión seca en Autoanalizador de acuerdo al SC09-LSF-01-P06; P, Ca, Mg, K, S, Na, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Al por digestión húmeda con HNO<sub>3</sub> y determinación por Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma (ICP) de acuerdo al SC09-LSF-01-P10. 3. El muestreo es responsabilidad del usuario. 4. Los resultados se refieren únicamente a las muestras ensayadas. 5. El tiempo de custodia de las muestras es de 45 días a partir del ingreso de la muestra. 6. El Reporte de Ensayo válido es el original firmado y sellado que se imprime a solicitud expresa del usuario; cuando el usuario solicita el envío del reporte por correo electrónico o fax libera al Laboratorio de resguardar la integridad y confidencialidad de sus resultados.

**Anexo 7. Resultados de variables evaluados en plantas de arroz a los 102 días después de la siembra en el ensayo de invernadero.**

Tratamiento	PF Aéreo (g)	Altura (cm)	PS Aéreo (g)
Testigo	3,46 A	49,65 A	0,92 A
T. Azospirillum	3,34 A	48,51 A	0,82 A
Hongo	3,38 A	49,19 A	0,89 A
Hongo+Azospirillum	3,28 A	48,64 A	0,87 A
Levadura	3,29 A	48,63 A	0,82 A
Levadura+Azospirillum	3,22 A	48,36 A	0,83 A
Bacteria	3,27 A	48,27 A	0,82 A
Bacteria+Azospirillum	3,39 A	48,50 A	0,89 A
Hongo+Bacteria+Levadura+Azospirillum	3,33 A	49,09 A	0,88 A

Tratamiento	PF Raíz (g)	Long. Raíz (cm)	PS Raíz (g)
Testigo	1,64 E	24,36 D	0,47 B
T. Azospirillum	0,77 B	22,74 CD	0,60 D
Hongo	1,12 C	23,48 CD	0,58 D
Hongo+Azospirillum	0,78 B	19,43 A	0,59 D
Levadura	1,37 D	22,25 BCD	0,41 A
Levadura+Azospirillum	0,68 AB	22,86 CD	0,50 BC
Bacteria	0,61 A	20,25 AB	0,46 AB
Bacteria+Azospirillum	0,63 A	21,70 ABC	0,47 AB
Hongo+Bacteria+Levadura+Azospirillum	1,19 C	21,12 ABC	0,56 CD

Tratamiento	Den.lon.rad (cm/cc)	Índice Raíz/Tallo Fresco (g)	Índice Raíz/Tallo seco (g)
Testigo	0,12 D	0,48 E	0,52 A
T. Azospirillum	0,11 BCD	0,24 B	0,76 D
Hongo	0,12 CD	0,34 C	0,67 BCD
Hongo+Azospirillum	0,10 A	0,24 B	0,69 CD
Levadura	0,11 BCD	0,42 D	0,51 A
Levadura+Azospirillum	0,11 CD	0,21 AB	0,66 BCD
Bacteria	0,10 AB	0,19 A	0,57 AB
Bacteria+Azospirillum	0,11 ABC	0,19 A	0,53 A
Hongo+Bacteria+Levadura+Azospirillum	0,11 ABC	0,36 C	0,64 BC