



Esta obra está bajo una [Licencia
Creative Commons Atribución-
NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú.](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/)

Vea una copia de esta licencia en
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**Solubilización de fosfatos por bacterias aisladas de la rizósfera de leguminosas
de cobertura creciendo en suelos degradados de la subcuenca del Cumbaza-
San Martín**

Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo

AUTOR:

Roy Dandi Casique Huamanguli

ASESOR:

Dr. Winston Franz Ríos Ruiz

Tarapoto – Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



Solubilización de fosfatos por bacterias aisladas de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos degradados de la subcuenca del Cumbaza-San Martín

AUTOR:

Roy Dandi Casique Huamanguli

Sustentada y aprobada el día 23 de noviembre del 2018, por los siguientes jurados

Dr. Carlos Rengifo Saavedra
Presidente

Ing. M.Sc. Segundo Darío Maldonado Vázquez
Secretario

Ing. Eybis José Flores García
Miembro

Dr. Winston Franz Ríos Ruiz
Asesor

Declaratoria de Autenticidad

Roy Dandi Casique Huamanguli, egresado de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Escuela Profesional de AGRONOMÍA de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, con DNI N° 70192800, con la tesis titulada: **Solubilización de fosfatos por bacterias aisladas de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos degradados de la subcuenca del Cumbaza-San Martín.**

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido auto plagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

De considerar que el trabajo cuenta con una falta grave, como el hecho de contar con datos fraudulentos, demostrar indicios y plagio (al no citar la información con sus autores), plagio (al presentar información de otros trabajos como propios), **falsificación** (al presentar la información e ideas de otras personas de forma falsa), entre otros, asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndonos a la normatividad vigente de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Tarapoto, 23 de noviembre del 2018



Roy Dandi Casique Huamanguli

DNI N° 70192800



Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres:	Casique Huamangoli Roy Dandi		
Código de alumno :	121105	Teléfono:	974709200
Correo electrónico :	roydan-1993@hotmail.com	DNI:	70192800

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de:	Ciencias Agrarias
Escuela Profesional de:	Agronomía

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	(X)	Trabajo de investigación	()
Trabajo de suficiencia profesional	()		

4. Datos del Trabajo de investigación

Título :	Solubilización de fosfatos por bacterias aisladas de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos degradados de la subcuenca del Combaiza San Martín.
Año de publicación:	2018

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	(X)	Embargo	()
Acceso restringido **	()		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

--

6. Originalidad del archivo digital.

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12° del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI "Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA".


Firma y huella del Autor

8. Para ser llenado en el Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto de la UNSM - T.

Fecha de recepción del documento.

06 / 10 / 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - T.
Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e
Innovación de Acceso Abierto - UNSM-T.

Ing. M. Sc. Alfredo Ramos Perea
Responsable

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

** **Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Dedicatoria

A *Jehová Dios*, quien ha sido mi más grande fortaleza, y mi compañía en los momentos más difíciles de mi vida y por permitirme escalar un peldaño más en la vida. A *mis padres*: Gilberto Casique Vela y Claudia Rosio Huamanguli Gonzales por todo el apoyo, el amor y la comprensión que siempre me brindaron, en toda esta etapa de mi vida, por todo el esfuerzo y sacrificio que hacen por mí, que me motivaron a salir adelante. A *mis hermanos*: Jenrry, Ivis Karina y Jessica, por sus palabras oportunas que me ayudaron a continuar y por estar siempre a mi lado.

Agradecimiento

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, por contribuir a mi formación profesional en el campo de la Agronomía. A mi asesor Dr. Winston Franz Ríos Ruiz (UNSM-T), por su apoyo y supervisión en la elaboración de la tesis. Al Mblgo. M.Sc. Renzo Alfredo Valdez Nuñez y al Ing. M. Sc. José Carlos Rojas García, por compartir sus conocimientos, tiempo, dedicación y guiarme en el desarrollo de técnicas y procedimientos que hicieron posible este trabajo de investigación. Y a mis queridos tíos Clorinda Casique Sandoval y Manuel Bellido, por su apoyo incondicional y a mi abuelita Natividad Gonzales, por alegrarme todos los días de mi vida.

Índice general

	Páginas
Dedicatoria	vi
Agradecimiento.....	vii
Índice general.....	viii
Resumen	xv
Abstract	xvi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. Importancia del fósforo en el suelo y sistemas biológicos.....	3
1.2. Bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF).....	5
1.3. El fósforo (P), como recurso finito.....	11
CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS	14
2.1. Ubicación y caracterización del área de estudio.....	14
2.2. Colecta de muestra de suelo de la subcuenca alta y media del Cumbaza	17
2.3. Propiedades físico - químicas y biológicas del suelo	18
2.4. Implementación y conducción del experimento.....	21
2.5. Instalación de las leguminosas de cobertura	23
2.6. Muestreo y colecta de suelos rizosféricos	24
2.7. Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato en suelos rizosféricos.....	25
2.8. Re aislamiento, purificación y conservación de BSF.....	27
2.9. Caracterización microscópica y morfocolonial de BSF	27
2.10. Reactivación de cepas BSF procedentes de leguminosas de cobertura.....	28
2.11. Evaluación cualitativa de la solubilización de fosfatos.....	28
2.11.1. Elaboración del pre-inóculo.....	28
2.11.2. Preparación de medios de cultivo.....	29
2.11.3. Inoculación de placas.....	29
2.11.4. Periodo de evaluación.....	29
2.12. Evaluación cuantitativa de la solubilización de fosfatos.....	30
2.12.1. Elaboración de pre-inóculo	30
2.12.2. Preparación de medios de cultivo.....	31
2.12.3. Inoculación de medios.....	31

2.12.4. Periodo de evaluación	31
2.12.5. Medición del fosfato soluble	31
2.13. Preparación de la curva patrón de fosfatos (PO ₄).....	32
2.14. Medición del pH y acidez titulable en sobrenadante.....	33
2.15. Diseño de investigación.....	33
2.16. Análisis estadístico	34
2.16.1. Prueba de normalidad, desviación estándar y determinación del error estándar	34
2.16.2. Análisis de varianza.....	34
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1. Aislamiento, purificación y conservación de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF).....	35
3.2. Caracterización morfocolonial de los aislamientos.....	38
3.3. Evaluación cualitativa de la solubilización de fosfatos por BSF	45
3.3.1. Índice de solubilización del P (ISP)	45
3.3.2. Eficiencia de la solubilización de fosfato de ácido de calcio (CaHPO ₄) y fosfato tricálcico (Ca ₃ (PO ₄) ₂).....	47
3.3.3. Eficiencia de la solubilización de fosfato de aluminio (AlPO ₄) y fosfato hierro (FePO ₄)	56
3.4. Evaluación cuantitativa de la solubilización de fosfatos por BSF	59
3.4.1. Solubilización de Ca ₃ (PO ₄) ₂ por bacterias rizosféricas de leguminosas..	60
3.4.2. Solubilización de AlPO ₄ por bacterias rizosféricas de leguminosas	64
3.4.3. Solubilización de FePO ₄ por bacterias rizosféricas de leguminosas	68
CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS.....	81

Índice de tablas

	Páginas
Tabla 1. Mecanismos de solubilización de fosfatos por microorganismos	6
Tabla 2. Descripción del uso, características del suelo y predominancia de cobertura vegetal en las áreas de estudio de la región San Martín	15
Tabla 3. Caracterización física – químico de suelos procedentes de las zonas de colecta	19
Tabla 4. Caracterización física – químico de suelos procedentes de las zonas de colecta	20
Tabla 5. Análisis microbiológico de suelos de las zonas de colecta.....	21
Tabla 6. Modo de preparación de soluciones estandarizadas para curva patrón	33
Tabla 7. Tratamientos en estudio para la evaluación de la solubilización de fosfatos insolubles	34
Tabla 8. Procedencia de cepas de bacterias rizosféricas con actividad de solubilización de fosfato insoluble aisladas de rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la subcuenca del Cumbaza	36
Tabla 9. Caracterización morfocolonial de aislamientos de BSF mineral insoluble procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura tropicales creciendo en suelos degradados de la sub-cuenca alta y media del Cumbaza-San Martín-Perú.....	39
Tabla 10. Índice de solubilización del P (ISP) por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín.....	46
Tabla 11. Análisis de varianza para la eficiencia de solubilización de fosfato ácido de calcio (CaHPO_4).....	47
Tabla 12. Análisis de varianza para la eficiencia de solubilización de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).....	47
Tabla 13. Eficiencia de la solubilización de CaHPO_4 en tres diferentes tiempos, realizado por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín	49

Tabla 14. Eficiencia de la solubilización $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en tres diferentes tiempos, realizado por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín	51
Tabla 15. Análisis de varianza para la eficiencia de solubilización de AlPO_4	56
Tabla 16. Eficiencia de la solubilización de fuentes de fosfatos insolubles definidos (AlPO_4 y FePO_4) por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín	58
Tabla 17. Análisis de varianza para la eficiencia de solubilización de fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	61
Tabla 18. Análisis de varianza para la solubilización de AlPO_4	64
Tabla 19. Análisis de varianza para la solubilización de FePO_4	68

Índice de figuras

	Páginas
Figura 1. Mapa de la sub cuenca del Cumbaza indicando la localización de las seis localidades de muestreo de suelos.....	14
Figura 2. Muestreo adecuado de suelo para análisis microbiológicos.....	17
Figura 3. Procedimiento de colecta de suelo	18
Figura 4. Vista panorámica del vivero para la multiplicación de BSF	21
Figura 5. Instalaciones del laboratorio de Microbiología Agrícola.....	22
Figura 6. Sustrato suelo: suelo en estudio y vermiculita proporción 1:1.....	23
Figura 7. Procedimiento para la instalación de plantas de cobertura.....	23
Figura 8. Plantas de leguminosas a los 60 días.....	24
Figura 9. Procedimiento para el Muestreo y colecta de suelos rizosféricos	24
Figura 10. Diluciones para el aislamiento de BSF.....	26
Figura 11. Reaislamiento, purificación y conservación de BSF.....	27
Figura 12. Elaboración del pre-inóculo	28
Figura 13. Inoculación en medio NBRIP solido con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a los 3 días de incubación	29
Figura 14. Evaluación cualitativa de la solubilización de fosfatos.....	30
Figura 15. Inoculación e incubación de los medios de cultivos	31
Figura 16. Medición del fosfato soluble	32
Figura 17. Medición de pH y acidez titulable del sobrenadante del medio del cultivo.....	33
Figura 18. Aislamiento de BSF en Agar GELP. Las flechas indican el crecimiento de colonias capaces de solubilizar fosfato mineral insoluble a través de la formación de un halo de solubilización	35
Figura 19. Solubilización de dos fuentes de fosfatos de calcio con mayor $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y menor (CaHPO_4) nivel de insolubilidad por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín.....	53
Figura 20. Eficiencia de la solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, durante tres periodos de evaluación por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín	54

- Figura 21.** Eficiencia de la solubilización de fosfato ácido de calcio (CaHPO_4), durante los tres periodos de evaluación por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín55
- Figura 22.** Halos de solubilización producidos por los aislamientos que solubilizaron AlPO_457
- Figura 23.** Concentración de P soluble por la acción de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de leguminosas en medio líquido con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente entre sí. Probado por la prueba de rango múltiple de Duncan con un rango crítico del 5% 63
- Figura 24.** Concentración de P solubilizado por la acción de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de leguminosas en medio líquido con AlPO_4 (barras azules) y P consumido por cepas bacterianas aisladas (barras celestes) 67
- Figura 25.** Prueba de Duncan ($P < 0,05$) para el efecto de la solubilización de AlPO_4 por bacterias rizosféricas de leguminosas. Los valores se determinaron tomando la diferencia entre la cantidad de P soluble que se encuentra en el medio de cultivo inoculado y la cantidad en el tratamiento de control sin inoculación. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente entre sí 68
- Figura 26.** Concentración de P solubilizado (barras azules) y fosfato residual (barras celestes) como consecuencia de la acción solubilizadora de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de leguminosas en medio GELP líquido con FePO_4 71
- Figura 27.** Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el efecto de la solubilización de FePO_4 por bacterias rizosféricas de leguminosas. Los valores se determinaron tomando la diferencia entre la cantidad de P soluble que se encuentra en el medio de cultivo inoculado y la cantidad en el tratamiento de control sin inoculación. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente entre sí 72

Índice de Anexos

	Páginas
Anexo 1. Medios de cultivos para la evaluación de la solubilización de fosfatos insolubles	81
Anexo 2. Soluciones y reactivos.....	83
Anexo 3. Mezcla reactiva para medir fosfato soluble	83
Anexo 4. Curva patrón para determinar amonio	83
Anexo 5. Figura de la curva patrón de fosfato soluble (PO ₄).....	84
Anexo 6. Evaluación cuantitativa de la solubilización de AlPO ₄	85
Anexo 7. Evaluación cuantitativa de la solubilización de FePO ₄	88

Resumen

El fósforo (P) es esencial para las plantas, más su disponibilidad en suelos tropicales es baja (< 7 ppm) debido a su adsorción en suelos ácidos con hidróxidos de Fe y Al. Puesto que el P es clave para mejorar la productividad agrícola en suelos tropicales degradados, una forma sostenible de aumentar el P disponible para las plantas es empleando bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF). El estudio permitió el aislamiento y caracterización de bacterias rizosféricas en cuatro leguminosas de cobertura, creciendo en suelos ácidos degradados (SAD) de la subcuenca del alto y medio Cumbaza-San Martín. Las BSF se agruparon de acuerdo a su origen y características morfocoloniales, y una cepa representante fue utilizada para estudios de solubilización. Se evaluó la eficiencia de solubilización cualitativa (EFS %) y cuantitativa de fosfatos (mg P L^{-1}) en medio NBRIP y medio GELP, ambos con fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), fosfato de hierro (FePO_4) y fosfato de aluminio (AlPO_4). Se aislaron 132 cepas de bacterias procedentes de la rizósfera *Vigna unguiculata*, *Canavalia ensiformis*, *Cajanus cajan* y *Crotalaria juncea*. Solo 44 cepas fueron representantes de los grupos morfocoloniales en estudio. En relación a la EFS%, el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ fue solubilizado por 80% de las cepas (127,92-505,75%), 9,1 % solubilizaron AlPO_4 (148,05- 241,80%) y ninguna cepa solubilizó FePO_4 . En la evaluación cuantitativa, la solubilización de FA fue elevada ($55,99 \text{ mg P L}^{-1}$) así como en la solubilización de FePO_4 ($43,29 \text{ mg P L}^{-1}$). En relación a la solubilización de AlPO_4 y FePO_4 , se observaron correlaciones positivas para pH y negativas para la acidez titulable, indicando que este proceso está influenciado por el tipo de suelo y el tipo de cepa. En conclusión, los SAD albergan BSF con buen potencial de solubilización para ser empleados como inoculantes.

Palabras claves: Suelos ácidos; Bacterias Solubilizadoras de Fosfatos; Leguminosa de cobertura

Abstract

Phosphorus (P) is essential for plants, but its availability in tropical soils is low (<7 ppm) due to its adsorption in acid soils with Fe and Al hydroxides. Since P is key to improving agricultural productivity in degraded tropical soils, a sustainable way to increase the P available for plants is using phosphate solubilizing bacteria (PSB). The study allowed the isolation and characterization of rhizospheric bacteria in four cover legumes, growing in degraded acid soils (DAS) of the upper and middle sub-basin of Cumbaza-San Martín. The BSF were grouped according to their origin and morphocolonial characteristics, and a representative strain was used for solubilization studies. The qualitative (EFS%) and quantitative solubility of phosphates (mg P L⁻¹) in NBRIP medium and GELP medium were evaluated, both with tricalcium phosphate (Ca₃(PO₄)₂), iron phosphate (FePO₄) and phosphate aluminum (AlPO₄), respectively. We isolated 132 strains of bacteria from the rhizosphere *Vigna unguiculata*, *Canavalia ensiformis*, *Cajanus cajan* and *Crotalaria juncea*. Only 44 strains were representatives of the morphocolonial groups under study. In relation to the SAI%, Ca₃(PO₄)₂ was solubilized by 80% of the strains (127.92-505.75%), 9,1% solubilized by AlPO₄ (148.05- 241.80%) and no strain solubilized FePO₄. In the quantitative evaluation, the solubilization of FA was high (55.99 mg P L⁻¹) as well as in the solubilization of FePO₄ (43.29 mg P L⁻¹). In relation to the solubilization of AlPO₄ and FePO₄, positive correlations were observed for pH and negative for titratable acidity, indicating that this process is influenced by the type of soil and the type of strain. In conclusion, DASs harbor PSB with good solubilization potential to be used as inoculants.

Keywords: Acid soils; Phosphate Solubilizing Bacteria; Legume coverage



Introducción

El fósforo (P) después del nitrógeno (N), es el nutriente más requerido por las plantas (Oufdou *et al.*, 2016). Es un componente fundamental de los ácidos nucleicos (ARN y ADN), proteínas, fosfolípidos y muchos cofactores como el Adenosin Trifosfato (ATP) y Nicotinamida Adenina Di nucleótido Fosfato (NADP) (Shrivastava *et al.*, 2018). Por lo que es esencial para los principales procesos metabólicos dependientes de la energía como la fotosíntesis, respiración y fosforilación de proteínas, su deficiencia afecta significativamente el crecimiento, desarrollo, reproducción de las plantas (Eida *et al.*, 2017).

El 9,25% de los suelos tropicales de la región San Martín son usados para la explotación agrícola (INEI, 2018). Sin embargo, la disponibilidad del P en suelos tropicales es baja (< 7 ppm) debido a su adsorción en suelos ácidos, ya que en estos suelos predominan arcillas 1:1 y oxi-hidróxidos de hierro (Fe) y de aluminio (Al) (Marra *et al.*, 2011). Otro fenómeno que reduce la disponibilidad de P en el suelo y por consiguiente su absorción por las plantas, es la precipitación, que puede ocurrir con los iones de Fe^{+3} y Al^{+3} en condiciones de alta acidez, o iones de Ca^{+2} en suelos calcáreos, neutras o alcalinas (Eida *et al.*, 2017). Esto conlleva al uso de grandes cantidades de fertilizantes fosfatados naturales y de síntesis química para cubrir las necesidades de los cultivos. Debido a que las reservas de fosfato natural son finitas (Scholz *et al.*, 2013) y los de síntesis química requieren de elevada cantidad de petróleo para su síntesis, un uso inadecuado puede ocasionar inseguridad alimentaria a nivel global (Cordel y White, 2015).

Considerando la importancia del P en la agricultura y en el proceso de recuperación de suelos degradados, la búsqueda de alternativas sostenibles a los fertilizantes fosfatados es de gran importancia (Lang *et al.*, 2018). Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF), son un grupo diverso de microorganismos capaces de solubilizar el P no disponible (Bahena *et al.*, 2016). La solubilización de fosfato se puede dar a través de varios mecanismos, siendo la más extendida la producción de ácidos orgánicos (Bashan *et al.*, 2013), además los procesos enzimáticos (fosfatasas y fitasas) se encuentran extendidos sobre todo en suelos con altos niveles de materia orgánica (Fernández y Rodríguez, 2006). Los principales géneros de BSF son: *Bacillus*, *Pseudomona*, *Rhizobium*, *Serratia* y *Enterobacter* (Behera *et al.*, 2014).

La rizósfera de las plantas albergan comunidades complejas de microorganismos, específicamente bacterias (Glick, 2012). Se han reportado varios estudios sobre el aislamiento de BSF aisladas de rizósfera de diversas plantas, como leguminosas (Marra *et al.*, 2012; Bahena *et al.*, 2015; Selvi *et al.*, 2017). La información sobre el aislamiento y evaluación de la actividad de BSF procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura como: *Vigna unguiculata*, *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria juncea*; es mínima. Por lo que una estrategia sostenible para reducir el uso de fertilizantes fosfatados en la agricultura y recuperación de suelos degradados, consiste en aumentar la disponibilidad de fosfatos solubles a la planta, a través de la inoculación de cultivos con BSF.

La hipótesis de la investigación es que en los suelos de la subcuenca de Cumbaza persisten bacterias solubilizadoras de fosfatos, capaces de asociarse a la rizósfera de leguminosas de cobertura.

Para este fin, el objetivo fue aislar y evaluar la capacidad de solubilización de fosfatos de bacterias rizosféricas de cuatro leguminosas de cobertura, *Crotalaria juncea*, *Cajanus cajan*, *Vigna unguiculata* y *Canavalia ensiformis*, creciendo en 6 suelos degradados de la subcuenca del alto y medio Cumbaza-San Martín, a partir de tres fuentes insolubles de fosfatos (Fosfato tricálcico, fosfato de fierro y fosfato de aluminio). Los objetivos específicos fueron: a) Aislar, purificar y conservar bacterias rizosféricas solubilizadoras de fosfato de 04 leguminosas de cobertura, creciendo en suelos de la subcuenca alta y media del Cumbaza-San Martín b) Realizar la caracterización Gram y morfológica de las BSF; y c) Evaluar cuantitativa y cualitativamente la solubilización en tres fuentes de fosfatos inorgánicos insolubles (Fosfato tricálcico, fosfato de hierro y fosfato de aluminio) por parte de las bacterias rizosféricas aisladas.

La estructura del trabajo incluye tres capítulos: Capítulo I: Revisión bibliográfica; Capítulo II: Material y métodos; Capítulo III: Resultados y discusión.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Importancia del fósforo (P) en el suelo y sistemas biológicos

El P es uno de los principales macronutrientes esenciales para el crecimiento biológico y el desarrollo de las plantas (Behera *et al.*, 2014). Más del 90 % del P total en el sistema suelo-planta-animal está en los suelos y menos del 10 % en el resto de los sistemas biológicos (Restrepo *et al.*, 2015). En el suelo se puede encontrar en formas orgánicas e inorgánicas (Ingle y Padole, 2017), encontrándose en un rango de 400 a 1200 mg kg⁻¹ (Behera *et al.*, 2014). Estas formas de P difieren en su comportamiento y destino en los suelos (Shen *et al.*, 2011).

El P de la solución del suelo es incorporado a través de los fertilizantes fosfatados o de la meteorización de los minerales primarios de P, como la apatita, hidroxiapatita y las oxiapatitas cuya principal característica es la insolubilidad (Bashan *et al.*, 2013). La liberación del P disponible a partir de estos minerales por meteorización es generalmente demasiado lenta para satisfacer la demanda de los cultivos (Shen *et al.*, 2011). Una pequeña cantidad es absorbida por las plantas y el resto es convertido en fósforo inorgánico (Pi) y fósforo orgánico (Po) por adsorción, precipitación o incorporación (Eida *et al.*, 2017).

En los suelos tropicales, el contenido total de P es alto; sin embargo, el contenido disponible para las plantas es muy bajo, aproximadamente 7 mg/kg de suelo, esta concentración limita la productividad de las plantas debido a que la mayor parte del P aplicado es adsorbida en la superficie de los minerales abundantes en estos suelos (sesquióxidos), tales como óxi-hidróxidos de Fe y de Al (Marra *et al.*, 2011; Shrivastava *et al.*, 2018). Esto también es debido a la precipitación de P con los iones Fe⁺³ y Al⁺³ en suelos ácidos y con iones Ca⁺² en suelos alcalinos (Eida *et al.*, 2017). Así, el fosfato tricálcico [Ca₃(PO₄)₂], el fosfato dicálcico dihidrato (CaHPO₄ · 2H₂O) (brushita), fosfato dicálcico (CaHPO₄) (monetita) y fosfato octacálcico [Ca₈H₂(PO₄)₆ · 5H₂O] dominan en suelos neutrales y alcalinos, mientras la strengita (FePO₄ · 2H₂O) y Variscita (AlPO₄ · 2H₂O) predominan en los suelos ácidos (Bashan *et al.*, 2013; Shrivastava *et al.*, 2018). La reversibilidad de estas formas no-lábiles de P es baja y por lo tanto menos disponible para

las plantas. Por ello la mayoría de los suelos tropicales son deficientes en fósforo disponible (Marra *et al.*, 2011).

El Po en los suelos tropicales es también una fuente importante de P para las plantas, por que compone del 30% a 90% de P total, de las cuales solo 0,1% existe en una forma soluble disponible para la absorción de la planta (Eida *et al.*, 2017). El Po tiene su origen en los residuos vegetales añadidos al suelo, productos de su descomposición microbiana (Eida *et al.*, 2017). Las principales formas son los fosfatos de inositol, que consisten en 10 a 80% del Po total además de los fosfolípidos (0,5-7%), ácidos nucleicos (aproximadamente 3%), y otros ésteres de fosfato (aproximadamente 5 %) (Restrepo *et al.*, 2015).

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) juegan un papel fundamental y directo en el ciclo de P en el suelo, alterando la adsorción y los equilibrios de precipitación para liberar P libre en la solución del suelo (solubilización) y facilitar la movilización de Po (mineralización) poco disponible e indirectamente induciendo cambios bioquímicos, moleculares y fisiológicos en las plantas, lo que a su vez conduce a la alteración de la disponibilidad de P en el suelo (Khan *et al.*, 2014).

En términos de fuentes de nutrientes para las plantas en el suelo se distinguen tres formas principales de P: I) Pi en la solución II) Po y III) Pi asociado a partículas minerales; de las cuales, el P en la solución, principalmente en forma de ortofosfato (PO_4^-), es el ion disponible para las plantas (Restrepo *et al.*, 2015). La disponibilidad del P del suelo para la nutrición de las plantas depende de tres procesos principales que afectan la concentración del P en la solución del suelo (Behera *et al.*, 2014):

1. Disolución por precipitación (equilibrio mineral).
2. Adsorción por desorción (interacciones entre el P en solución y las superficies sólidas del suelo)
3. Mineralización por inmovilización (conversiones mediadas biológicamente entre formas orgánicas e inorgánicas del P).

Las raíces de las plantas absorben varias formas de P, de las cuales la mayor parte se absorbe en las formas de H_2PO_4^- , HPO_4^- o PO_4^{-3} dependiendo del pH del suelo (Shrivastava *et al.*, 2018). El ion H_2PO_4^- es favorecido por los pH bajos (suelos tropicales), mientras que el ion HPO_4^- por los pH más altos (Karpagam y Nagalakshmi, 2014). Una vez dentro de la raíz, el P se incorpora a compuestos orgánicos como ácidos nucleicos,

fosfoproteínas, fosfolípidos, enzimas y compuestos fosfatados ricos en energía como la ATP. Desempeñando un papel importante en la fotosíntesis, respiración, almacenamiento y transferencia de energía, división celular, biosíntesis y la fijación de nitrógeno en las leguminosas (Khan *et al.*, 2014).

1.2 Bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF)

Los fosfatos insolubles que no pueden ser asimilados por las plantas, pueden ser llevados a formas solubles por la acción de muchos microorganismos que se encuentran en la rizósfera, siendo las bacterias más efectivas en procesos de solubilización de fosfato en comparación a los hongos (Ingle y Padole, 2017). Entre las comunidades microbianas de la rizósfera, las bacterias (rizobacterias) son las más conocidas y las más abundantes (95%), esto debido a su alta tasa de crecimiento y a la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (Glick, 2012). Por lo general, un gramo de suelo fértil puede contener entre 10^1 - 10^{10} bacterias, y su peso vivo puede superar los 2000 kg/ha. (Behera *et al.*, 2014). Las poblaciones de BSF son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de las plantas favoreciendo en su crecimiento o desarrollo (Noumavo *et al.*, 2016). Por lo que una mayor población de BSF son reportadas en suelo rizosférico que en el suelo no rizosférico (Behera *et al.*, 2014).

Entre los géneros bacterianos solubilizadores de fosfatos se encuentran *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Azotobacter*, *Microbacterium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Rhodobacter*, y *Pantoea* (Behera *et al.*, 2014; Bahena *et al.*, 2015; Panda, *et al.*, 2016). Algunas especies mencionadas que presentan elevada capacidad para solubilizar fosfatos insolubles bajo condiciones *in vitro*, se han aislado de la rizósfera de leguminosas, tales como *Vigna unguiculata* (Marra *et al.*, 2012; Toro *et al.*, 2013), *Vigna radiata* (Arfarita *et al.*, 2017), *Vicia faba*, *Cicer arietinum* y *Pisum sativum* (Rfaki *et al.*, 2014). Esta capacidad para solubilizar se encuentra incluso entre las bacterias nodulantes de leguminosas o llamados rizobios, tales como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* (Marra *et al.*, 2011). *Rhizobium* junto con *Pseudomonas* y *Bacillus*, están entre las bacterias con mayor potencial de solubilización (Behera *et al.*, 2014; Pingale y Virkar, 2017). En cualquier caso, es evidente que la capacidad solubilizadora de fosfatos está ampliamente distribuida dentro de la taxonomía bacteriana y edáfica. (Torres y Reyes, 2014).

Las bacterias transforman los fosfatos insolubles a formas solubles por la acción de diferentes mecanismos directos e indirectos. Entre ellos destacan: 1) Producción de ácidos orgánicos. 2) Acomplejamiento de metales. 3) Reducción de metales. 4) Solubilización enzimática. 5) Disolución indirecta de fosfatos. Estos procesos de solubilización de fosfato mineral, en principio, involucran varias reacciones químicamente diferentes (Tabla 1) (Bashan *et al.*, 2013). Siendo la más extendida, la producción de ácidos orgánicos. Entre los ácidos orgánicos de bajo peso molecular, se ha reportado el ácido glucónico, cetoglucónico, oxálico, cítrico, láctico, y succínico (Prieto *et al.*, 2015). Entre ellos, el ácido glucónico parece ser el medio más frecuente de solubilización mineral de fosfato (Borah *et al.*, 2017). Sin embargo, los procesos enzimáticos (fosfatasas y fitasas) se encuentran extendidos sobre todo en suelos con altos niveles de materia orgánica, jugando un papel importante en la mineralización del Po en el suelo (Behera *et al.*, 2014).

Tabla 1

Mecanismos de solubilización de fosfatos por microorganismos

Tipo de proceso	Principal causa de disolución mineral	Principal reacción que lleva a la disolución de minerales	Aplicabilidad a fosfatos minerales
Acidificación del medio	La liberación de protones (H ⁺) o producción de ácidos inorgánicos fácilmente dissociables	Disminución del pH del medio, formación de hidrofosfatos de mayor solubilidad	Fosfato de Ca
Acomplejamiento de metales	Liberación de ácidos orgánicos o formadores de complejos. (quelantes)	Formación de complejos metálicos (incluyendo quelatos en los casos de Ácidos di -Tricarboxílico, o hidroxicarboxílicos)	Fosfato de Ca, Al y Fe
Reducción de metal	Actividad REDOX de las bacterias o sus exudados (Metabolitos secundarios)	Reducción de metales con estados de oxidación variable (ligado al fosfato) a un estado de oxidación inferior (lo que se traduce en una fosfato más solubles)	Fosfato de Fe ⁺³
Disolución enzimática de fosfato	Liberación extracelular de enzimas específicas (Fosfatasas)	Hidrólisis enzimática de ésteres de fosfato orgánicos poco solubles liberando fosfatos inorgánicos	Diversos ésteres de fosfatos orgánicos (fitatos, fosfolípidos)
Disolución indirecta de fosfatos	Estimulación microbiana en la exudación de ácidos orgánicos por las plantas	Igual que para el tipo 2 (Acomplejación de metales) pero relacionados a interacciones planta-microbio	Fosfato de Ca, Al y Fe

Fuente: Bashan *et al.*, (2013).

Marra *et al.*, (2011), evaluaron la capacidad de solubilización de Pi de baja solubilidad, en siete cepas de rizobios utilizadas en la industria de inoculantes y con un control positivo no nodulante. Se realizaron dos experimentos para determinar si las cepas eran capaces de solubilizar CaHPO_4 , $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ y $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en medio sólido y líquido. En medio sólido Glucosa- Extracto de Levadura Peptona (GELP) ninguna de las cepas solubilizó $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sin embargo, *Burkholderia cepacia* LMG 1222, *Bradyrhizobium* sp. UFLA 03-84 y *Rhizobium tropici* CIAT 899 solubilizaron CaHPO_4 de manera eficiente. *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19424 y *Bradyrhizobium japonicum* BR 3267, también fueron capaces de solubilizar $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$. En medio GELP líquido, *Burkholderia cepacia* solubilizó todas las fuentes de fosfato, pero ninguna cepa nodulante de leguminosas solubilizó $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$. *Rhizobium tropici* y *Rhizobium etli* fueron las únicas bacterias nodulantes de leguminosas capaces de solubilizar las otras fuentes de fosfato en medios líquidos, disolviendo tanto CaHPO_4 como $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, obteniendo una correlación negativa entre el pH del medio de cultivo y la concentración de fosfato soluble cuando la fuente de P fue CaHPO_4 o $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Marra *et al.*, (2012) aislaron bacterias de suelos con altas concentraciones de P insoluble de las ciudades de Brasil (Lavras y Patos de Minas), utilizando *Vigna unguiculata* L. como planta trampa. Obtuvieron 78 cepas, que se caracterizaron según sus atributos culturales en medio de cultivo 79, con las cepas inoculantes de caupí *Bradyrhizobium* sp UFLA 03-84, *Bradyrhizobium elkani* INPA 03-11B y *Bradyrhizobium japonicum* BR 3267 y *Burkholderia cepacia* LMG1222 T, que se usó como controles positivos para la solubilización de P. Se evaluó la eficiencia de solubilización de CaHPO_4 , $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ y $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en medios sólidos y líquidos. En medio GELP sólido más cepas fueron capaces de solubilizar CaHPO_4 que $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ y ninguna de las cepas solubilizó $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. En medio GELP líquido más cepas fueron capaces de solubilizar CaHPO_4 (54%) que $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (36%), y pocos fueron capaces de solubilizar $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ (17%), encontrando más cepas solubilizando CaHPO_4 y el $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ insoluble en medio líquido que en medio sólido. También obtuvieron una correlación negativa entre el pH del medio de cultivo y la concentración de fosfato soluble cuando la fuente de fosfato fue CaHPO_4 y $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Rfaki *et al.*, (2014), a través del medio Fosfato del Instituto Nacional de Investigaciones Botánicas (NBRIP) y el análisis de secuencia de 16S rDNA se aislaron e identificaron BSF de la rizósfera de tres leguminosas (*Vicia faba*, *Cicer arietinum* y *Pisum sativum*)

cultivadas en suelos agrícolas de la región de Meknes-Marruecos. Se seleccionaron ocho aislamientos basados en la solubilización del $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en medio sólido con índice de solubilización (IS) y concentración del fosfato solubilizado en medio líquido. Los aislados bacterianos se identificaron en función del gen 16S rRNA. El índice de solubilización de P de estos aislamientos varió de 2,51 a 6. La caída en el pH del medio varió de 6,8 a 3,2 con el crecimiento continuo de estos aislamientos durante siete días. El $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilizado en medio líquido varió de 50,95 a 113,11 mg L^{-1} . Las cepas se agruparon bajo los géneros *Enterobacter*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Rahnella*, *Bacillus* y *Burkholderia*, de las cuales 85,5% de las cepas fueron Gram negativos.

Cisneros, (2015) aisló 26 bacterias rizosféricas de *Typic melanudans* de Cajibío (Cauca, Colombia), en tres agro ecosistemas: café sin sombra, café con sombra y relicto de bosque secundario, evaluando la eficiencia solubilizadora de fosfato (ESF) en Ca-P, Al-P, Fe-P en medios Pikovskaya sólido y líquido, obteniendo una mayor solubilización en Ca-P > Al-P > Fe-P. Los cinco aislamientos bacterianos con mayor ESF se seleccionaron para ser evaluados en medio de cultivo líquido, donde se encontró una mayor solubilización en el medio con Ca-P a comparación de Al-P y Fe-P. También cuantificaron e identificaron los ácidos orgánicos presentes en las tres fuentes de fósforo por HPLC, siendo ellos los ácidos cítricos, glucónico y málico, y láctico con mayor presencia en el medio de Ca-P. En todas las condiciones, se observó que ocurrió acidificación de los medios, siendo más fuerte en Fe-P y Al-P.

Costa *et al.*, (2016) evaluaron 26 cepas bacterianas aisladas de nódulos de *V. unguiculata*, creciendo en suelos aluviales de Brasil. Se evaluaron los siguientes procesos: fijación biológica nitrógeno (FBN) en vida libre, solubilización de fosfatos de calcio (CaHPO_4), aluminio ($\text{AlH}_6\text{O}_{12}\text{P}_3$) y hierro ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y producción de ácido indol-3-acético (AIA). Entre las cepas, el 80% solubilizó CaHPO_4 y solo una cepa solubilizo $\text{AlH}_6\text{O}_{12}\text{P}_3$ y ninguna cepa solubilizo $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Entre las cepas que solubiliaron el CaHPO_4 , *Enterobacter* sp. UFPI B5-6 y *Pseudomonas* UFPI B5-8A promovieron los índices de solubilización final más altos 3,54 y 2,32, respectivamente, similares a la cepa control *Acinetobacter* sp. (2,44). Ninguna de las cepas promovió un alto índice de solubilización. De acuerdo con el inicio de la solubilización, 11 cepas comenzaron a solubilizar al tercer día después de la inoculación y, por lo tanto, se consideraron tempranas. Solo la cepa *Enterobacter* sp. UFPI B5-4 pudo solubilizar el $\text{AlH}_6\text{O}_{12}\text{P}_3$; sin embargo, esta cepa promovió un índice de solubilización (IS) bajo.

Manzoor *et al.*, (2016) evaluaron el efecto del uso separado y combinado de BSF nativas, estiércol de aves y compost en la solubilización y mineralización de fosfato de roca y su efecto posterior sobre el crecimiento y la acumulación de P de maíz (*Zea mays* L.). Ellos aislaron cincuenta y siete bacterias procedentes de la rizósfera y rizoplano de *Zea maíz* L, cultivados en suelos de Rawalakot Azad Jammu y Cachemira, Pakistán. Se evaluó la capacidad de solubilizar cuantitativamente, donde once aislados fueron capaces de solubilizar fosfato mineral insoluble $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en medio de cultivo Pikovskaya. El ISF de los aislados seleccionados varió de 1,94 a 3,69, mientras que la eficacia de solubilización de P (ESF) osciló entre 94,1 a 269,0%. Los aislamientos MRS18 y MRS27 mostraron los valores más altos. La solubilización de P en el medio líquido fue máxima a los 6 y 9 días de incubación, variando entre 9,91 – 44,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y los aislados MRS27 y MRS34 exhibieron la mayor solubilización. Las reacciones de Gram indicaron que siete aislados fueron Gram positivos y cuatro fueron Gram negativos. En el caso de la forma y agrupación celular, todos los aislamientos tenían forma de cocos, pero entre ellos, algunos estaban apareados y algunos estaban dispersos en forma de micrococos, diplococos y estafilococos, excepto dos que eran bacilos.

Panda *et al.*, (2016), identificaron poblaciones nativas de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) procedentes de las rizósferas de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Zingiber officinale* y *Amomum subulatum* cultivadas en suelos ácidos de diferentes regiones de Sikkim (India). Se aislaron 42 cepas de BSF en medio sólido Pikovskaya y NBRIP usando el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fuente de fosfato insoluble. Solo 26 cepas de BSF fueron seleccionadas de acuerdo al halo de solubilización en medio sólido. Siendo las poblaciones rizosfericas de arroz las más abundantes. La densidad de población de BSF varió entre 2-36 x 10⁶ cfu g⁻¹. El rendimiento de solubilización de los fosfatos de estos aislados estuvo en el rango de 46 a 160% en medio sólido y de 30,2 y 203,7 mg de fosfato/L en medio líquido Pikovskaya. Aunque todos los aislamientos fueron capaces de solubilizar el fosfato de Al y el fosfato de Fe significativamente, la solubilizaron de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ fue mayor los otros dos, donde la solubilización de AlPO_4 fue comparativamente menor entre las tres fuentes de fosfato. La cepa M510 promovió una máxima solubilización de 61,3 mg L⁻¹ y 103,4 mg L⁻¹, para AlPO_4 y FePO_4 respectivamente.

Sharon *et al*; (2016), evaluaron la capacidad de aislamientos rizosféricos de *Solanum lycopersicum* y *Solanum tuberosum* para solubilizar P insolubles. Las cepas que mostraron un halo de solubilización en medio de agar de Pikovskaya fueron seleccionadas para la

evaluación en medio sólido con el de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como única fuente de fosfato insoluble y en medio líquido utilizando el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 y $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. La mayor actividad de solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ se encontró en la cepa Pot1 (956 mg L^{-1}), mientras que la actividad más baja se encontró en la cepa Tom2 (328 mg L^{-1}). Una menor solubilización de $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, fue obtenida por la cepa Pot1 alcanzando apenas 60 mg L^{-1} . Mientras que ninguna cepa solubilizó AlPO_4 .

Borah *et al*; (2017), evaluaron cinco bacterias endofíticas aisladas de la planta de *Oryza sativa* y fueron evaluadas por su capacidad de solubilizar de fosfatos. Cinco de estos aislados que mostraron buena actividad de solubilización de fosfato se caracterizaron a nivel molecular y se probaron para la solubilización de fosfato usando tres fuentes diferentes de fosfatos fosfato tricálcico (FTC), AlPO_4 y FePO_4 . Los aislados mostraron una actividad máxima de solubilización de fosfato en el sexto día de incubación con una disminución en el pH del medio. *Bacillus subtilis* LP31 L03 mostró la mayor actividad de solubilización de fosfato en FTC, AlPO_4 y FePO_4 con 57,58; 6,10; 7,65 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Los aislados en estudio pudieron solubilizar fácilmente TCP seguido de FePO_4 . Siendo el menos solubilizado el AlPO_4 . La disminución en el pH del medio inoculado con *Bacillus subtilis* (LP31 L03) se registró como 4,02; 3,33 y 3,8 en TCP, AlPO_4 y FePO_4 , respectivamente, al sexto día.

Pradhan *et al*; (2017) evaluaron la capacidad de solubilización de fosfatos insolubles de cepas nativas de BSF aislados de suelos ácidos de Odisha-India en 3 fuentes insolubles ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , FePO_4 y $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$). Se recolectaron 106 muestras de suelo con un pH menor de 5,50 en cinco distritos de Odisha, Balasore, Cuttack, Khordha, Keonjhar y Mayurbhanj-India. Se seleccionó un aislado bacteriano de cada distrito y se analizó su eficacia de solubilización de fosfatos, en el medio líquido NBRIP con fosfatos complejos de Ca, Al y Fe. Las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* CTC12 y *Burkholderia cepacia* KHD08 solubilizaron en mayor proporción el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($393,30$ y $465,25 \text{ mg L}^{-1}$), AlPO_4 ($40,00$ y $34,50 \text{ mg L}^{-1}$), FePO_4 ($175,50$ y $168,75 \text{ mg L}^{-1}$), y $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ ($7,40$ y $42,00 \text{ mg L}^{-1}$) después de 8 días de incubación, respectivamente la máxima solubilización de las cinco cepas en el medio líquido se dio en las fuentes de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ seguido FePO_4 luego $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ y por último en AlPO_4 .

1.3 El fósforo (P), como recurso finito

La extracción de P de los minerales primarios (apatita), para la entrada de fertilizantes fosfatados, como la roca fosfórica (RF) o sus derivados, se utilizan para mitigar la indisponibilidad de P (Eida *et al.*, 2017). El Servicio Geológico de los Estados Unidos ha estimado las reservas mundiales de P en más de 300 mil millones de toneladas, de los cuales el 90% de las reservas se encuentran en 6 países: Marruecos (75%), China, Argelia, Siria, Sudáfrica y Jordania. No obstante, son Estados Unidos y, sobretodo China, los países que actualmente están extrayendo mayor P de sus yacimientos (USGS, 2018).

Sin embargo, muchos yacimientos de RF que se encuentran en las zonas tropicales y subtropicales no son explotados (Vaccari, 2009). Una razón es que las características de estas rocas fosfóricas, si bien son adecuadas para la aplicación directa, no reúnen las normas de calidad requeridas para producir fertilizantes fosfatados utilizando la tecnología convencional de procesamiento industrial (Zapata y Roy, 2007). Otra razón es que los depósitos son demasiado pequeños para justificar las inversiones necesarias para su explotación minera y procesamiento (Vaccari, 2009).

Alrededor del 95% de la extracción de los minerales fosfatados se utiliza en la industria de fertilizantes (Dorozhkin, 2011), el ácido sulfúrico y la RF son las materias primas para la producción del superfosfato simple y del ácido fosfórico. El ácido fosfórico es un importante producto intermediario para producir el superfosfato triple y los fosfatos de amonio (Zapata y Roy, 2007). Pero una parte se utiliza para la aplicación directa al suelo (Casanova, 1995). Si bien la RF puede ser una valiosa fuente de P para las plantas, no siempre es adecuada para su aplicación directa. Su idoneidad depende en parte de las impurezas minerales de origen natural, tales como arcilla, carbonato (CO_3^{2-}), hierro (Fe^{3+}) y aluminio (Al^{3+}) (IPNI, 2017).

Los suelos de las zonas tropicales y subtropicales son en su mayoría ácidos, con una alta capacidad de adsorción de P (Marra *et al.*, 2012). La baja disponibilidad de P para las plantas, conlleva a la necesidad del uso de fertilizantes en grandes cantidades, para un crecimiento óptimo y una producción adecuada de alimentos y fibras (Eida *et al.*, 2017). El uso de fuentes sintéticas de fosfatos (superfosfatos), son normalmente recomendados para corregir estas deficiencias de P, aumentando su aplicación, sobre todo en países en desarrollo donde importan estos fertilizantes, los que a menudo se hallan en abastecimiento

limitado y representan un gran desembolso para los agricultores de escasos recursos económicos (Scholz *et al.*, 2013).

La RF es un recurso no renovable (Cooper *et al.*, 2011; Scholz *et al.*, 2013). Según Sattari *et al.*, (2016), será necesario duplicar, para el año 2050, el uso de los fertilizantes fosfatados para cubrir la demanda de alimentos, en un mundo donde ya habrá 9.000 millones de humanos (Griggs *et al.*, 2013). Pero, para entonces, ya se habrá utilizado más de la mitad del P existente en los yacimientos. Sea como sea, de seguir con la producción actual 150 millones de toneladas métricas por año (Bashan *et al.*, 2013) las reservas se agotarán en no más de 100 años (Dawson y Hilton, 2011). Las reservas son finitas, se están malgastando, ya que gran parte de los fertilizantes aplicados no son asimilados por las plantas y, a través del suelo, acaban en el mar o en los lagos, donde desequilibran los ecosistemas (Cordell y White, 2014). Es por eso que una sobre fertilización de P suele ser aprovechada por las algas autótrofas para crecer descontroladamente, lo que genera eutrofización, ocasionando grandes pérdidas animales, económicas y ambientales (Anderson *et al.*, 2002; Vaccari, 2009). Por lo tanto, el agotamiento de las reservas de P está emergiendo como un serio desafío para la seguridad alimentaria mundial (Cordell y White 2015).

Los problemas potenciales asociados con los productos químicos de P, junto con el enorme costo que implica su fabricación, se suma la competencia por la RF de alta calidad con otras industrias: conservantes de alimentos, agentes anticorrosivos, cosméticos, fungicidas, cerámica, tratamiento de agua y la metalurgia, proporcionando productos más costosos (Bashan *et al.*, 2013). Esto ha conducido a la búsqueda de estrategias alternativas compatibles con el medio ambiente y económicamente viables para mejorar la producción de cultivos en suelos con deficiencia de P. La gestión sostenible del P debe centrarse en la comprensión de los requisitos previos para un suministro suficiente de P para mantener la seguridad alimentaria a largo plazo y prevenir la contaminación ambiental del P en la biodiversidad (Scholz *et al.*, 2013). Se ha sugerido que el P acumulado en suelos agrícolas sería suficiente para sostener los rendimientos máximos de cultivos en todo el mundo durante unos 100 años si estuviera disponible (Khan *et al.*, 2009; Eida *et al.*, 2017). Por lo que es imprescindible un manejo integrado de P adecuado para aumentar su eficiencia en el uso y explotar mejor los recursos acumulados en el suelo (Lang *et al.*, 2018).

Los inoculantes, que presentan microorganismos con actividad solubilizadora de fosfatos, capaces de incrementar los niveles de P en la planta, constituyen una alternativa respetuosa con el medio ambiente (Chen *et al.*, 2006).

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Ubicación y caracterización del área de estudio

Para el estudio se identificaron seis zonas correspondientes a la Sub cuenca del Cumbaza, parte alta, (Chirikyacu, Vista Alegre y El Chontal) y parte media (Aucaloma, Shapumba y San Antonio de Cumbaza) provincia de Lamas, Departamento de San Martín (Figura 1). La Sub cuenca del Cumbaza se caracteriza por presentar zonas de altitud entre los 410 a 1160 m.s.n.m. En general, los suelos en la parte alta están ubicados en las laderas de las colinas, son generalmente poco profundas, ácidos y de menor fertilidad (Tabla 3). En cada localidad se seleccionaron parcelas de 2500 m² que presentan suelos degradados, donde predominaban plantas de Shapumba (*Pteridium aquilinum*) y Cashucsha (*Imperata contracta*) (Tabla 2).

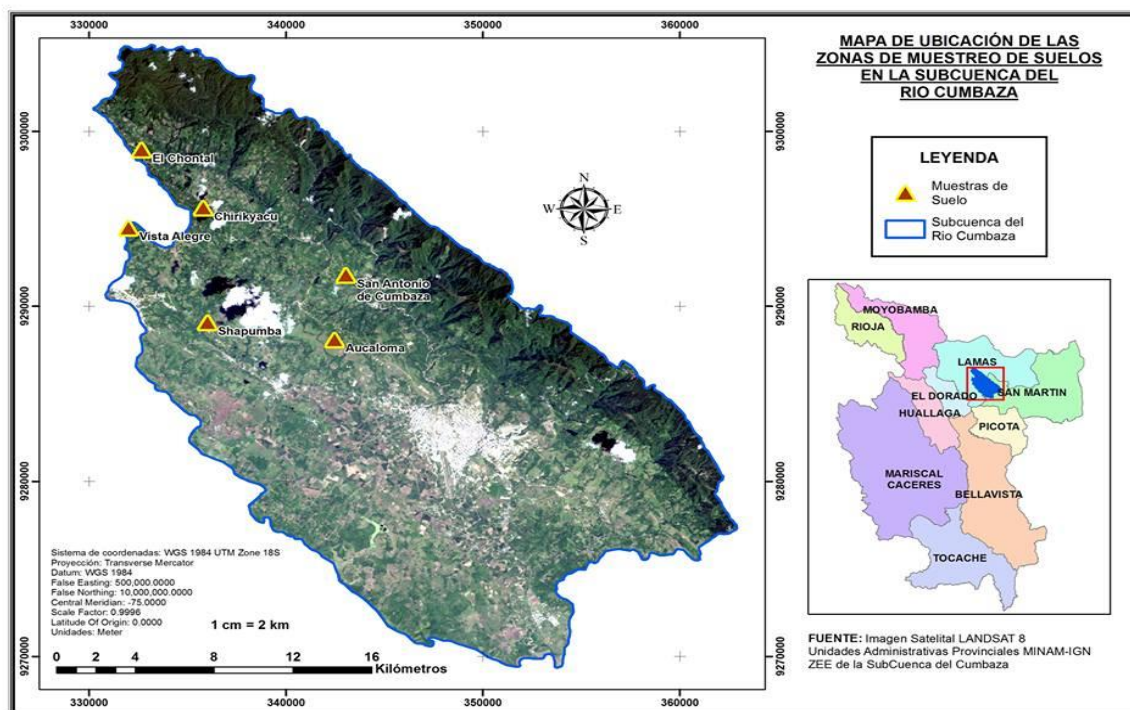








Figura 1. Mapa de la sub cuenca del Cumbaza indicando la localización de las seis localidades de muestreo de suelos. (Fuente: Imagen Satelital LANDSAT 8 Unidades Administrativas Provinciales MINAM-IGN ZEE de la Sub Cuenca del Cumbaza).

Tabla 2

Descripción del uso, características del suelo y predominancia de cobertura vegetal en las áreas de estudio de la región San Martín

Subcuenca	Distrito	Zona de muestreo	Descripción	Vista panorámica
	San Roque de Cumbaza	Chirikyacu	Cafetal abandonado hace 20 años, predominancia de <i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn. ("Shapumba"), <i>Pollalesta</i> sp. ("Ocuera negra"), <i>Phytolacca rivinoides</i> Kunth & Bouche ("Airambo"), <i>Vismia</i> sp. (" <i>Pichirina colorada</i> ") e <i>Imperata contracta</i> (Kunth) Hitchc (" <i>Cashucsha</i> ").	
Alto Cumbaza	Lamas	Chontal	Bosque primario hace 30 años, presencia de <i>P. aquilinum</i> (L.) Kuhn. "Shapumba" en la parte baja, y cultivo de <i>Ananas comosus</i> y <i>Coffea arábica</i> en la zona alta; además <i>Pollalesta</i> sp. ("Ocuera negra"), <i>Vismia</i> sp. (" <i>Pichirina colorada</i> ")	
	Lamas	Vista Alegre	Bosque primario hace 50 años, formación de bosque secundario hasta el 2014. Predominancia de <i>P. aquilinum</i> (L.) Kuhn. "Shapumba", <i>Imperata contracta</i> (Kunth) Hitchc (" <i>Cashucsha</i> "), <i>Crotalaria nitens</i> ("Sacha puspino").	

Subcuenca	Distrito	Zona de muestreo	Descripción	Vista panorámica
	San Roque de Cumbaza	Aucaloma	Predominancia de <i>P. aquilinum</i> (L.) Kuhn. "Shapumba", <i>Imperata contracta</i> (Kunth) Hitchc ("Cashucsha"), y las herbáceas <i>Dalechampia</i> sp. (Pucacuro huasca).	
Medio Cumbaza	San Antonio de cumbaza	San Antonio de Cumbaza	Bosque secundario con predominancia de <i>Adenaria floribunda</i> Kunth "Puca varilla", <i>Pollalesta</i> sp. ("Ocuera negra"), <i>Trema micrantha</i> (L.) ("Atadijo").	
	Rumisapa	Shapumba	Suelo degradado con presencia de <i>P. aquilinum</i> (L.) Kuhn. "Shapumba", <i>Imperata contracta</i> (Kunth) Hitchc ("Cashucsha"), <i>Miconia</i> sp. "Rifonia", <i>Sclerobium</i> sp. ("Ucshaquiuro"), <i>Roupala</i> sp. ("Arrean"), <i>Vochysia lomatophylla</i> ("Quillo sisa") y <i>Andropogon bicornis</i> (L.) ("Rabo de zorro").	

2.2 Colecta de muestra de suelo de la subcuenca alta y media del Cumbaza

Las muestras de suelo se colectaron de áreas degradadas en seis zonas de la Sub cuenca del Cumbaza, las zonas fueron Chirikyacu ($S6^{\circ} 29.065'$ $W76^{\circ} 22.038'$; 1087 m.s.n.m), Vista Alegre ($S6^{\circ} 22.830'$ $W76^{\circ} 31.132'$; 785 m.s.n.m), El Chontal ($S6^{\circ} 20.435'$ $W76^{\circ} 30.769'$; 1190 m.s.n.m), San Antonio de Cumbaza ($S6^{\circ} 24.286'$ $W76^{\circ} 25.181'$; 539 m.s.n.m), Aucaloma ($S6^{\circ} 26.296'$ $W76^{\circ} 25.440'$; 738 m.s.n.m) y Shapumba ($S6^{\circ} 25.747'$ $W76^{\circ} 28.977'$; 593 m.s.n.m). Colectadas en el mes de abril del 2016. Después de identificar los puntos de muestreo, las zonas fueron despejadas y se procedieron a colectar las muestras de suelo de la sub zonas parte alta (A), media (B) y baja (C) de la pendiente usando la metodología sugerida por Dionisio y Pimentel (2016). Donde se realizó un muestreo aleatorio en forma de zig-zag, tomando 1kg de suelo en 10 puntos equidistantes (10mts. aprox.) por sub zonas, haciendo un total de 30 sub muestras por cada zona, a una profundidad de 0 – 20 cm (figura 2).



Figura 2. Muestreo adecuado de suelo para análisis microbiológicos.

Luego se realizó una muestra compuesta que posteriormente fue homogenizado, y se tomó dos fracciones de muestra representativa (1 kg cada uno) para los análisis microbiológicos y fisico-químicos. Las muestras fueron empacadas en bolsas de polipropileno (10 x 12 cm), rotuladas y luego almacenadas en un cooler con hielo hasta su llegada al laboratorio. Las muestras para análisis microbiológicos fueron colocadas a 4°C, hasta su posterior análisis en el laboratorio de Microbiología Agrícola “Raúl Ríos Reátegui”, y la otra

fracción para los análisis físico-químicos se realizó en el Laboratorio de suelos y aguas, ambos de la Facultad de Ciencias Agrarias–UNSM-Tarapoto. Además de cada lugar de muestreo se colectaron 20 kilos por cada punto de muestreo, este sirvió para la instalación de plantas de leguminosas de cobertura bajo condiciones de invernadero.



Figura 3. Procedimiento de colecta de suelo: **A)** Muestreo de suelo. **B)** Homogenización de las muestras de suelo. **C)** Muestra de suelos para análisis microbiológicos y físico-químicos **D)** Transporte de las muestras para el laboratorio.

2.3 Propiedades físico - químicas y biológicas del suelo

El análisis físico-químico de las muestras de suelo colectadas en las seis zonas de la subcuenca se muestra en las Tablas 3 y 4 y los análisis microbiológicos en la Tabla 5.

Tabla 3*Caracterización física – químico de suelos procedentes de las zonas de colecta*

Área de muestreo de suelo	pH	CE μs	P mg L ⁻¹	K	MO	N	Arena %	Arcilla	Limo
Vista Alegre	4,89	68,30	5,81	41,33	2,71	0,14	53,33	16,67	39,00
Chontal	3,99	156,77	4,68	52,63	4,56	0,23	38,00	28,67	33,33
Chirikiyacu	3,78	171,37	3,48	110,76	4,47	0,22	41,67	22,00	36,33
Aucaloma	4,62	88,87	4,62	50,74	3,67	0,18	34,50	33,00	32,50
Shapumba	4,47	57,80	4,18	20,61	2,57	0,13	54,00	18,17	27,83
San Antonio de Cumbaza	6,40	275,17	7,94	233,86	5,22	0,26	31,83	44,50	23,67

pH: Potencial de hidrógeno; CE: Conductividad eléctrica; MO: Materia orgánica; N: Nitrogeno total; P: fósforo disponible; K: Potasio total

Tabla 4

Caracterización física – químico de suelos procedentes de las zonas de colecta

Área de muestreo de suelo	CIC	RAS	PSI	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	Al ⁺	Saturación de Al (Al+H) %
				meq 100 g ⁻¹				
Vista Alegre	2,52	0,37	6,67	1,04	0,23	0,17	0,86	0,99
Chontal	2,85	0,19	4,33	0,41	0,23	0,12	1,81	1,96
Chirikiyacu	3,81	0,21	3,33	0,52	0,29	0,12	2,47	2,60
Aucaloma	4,32	0,44	3,67	4,32	0,38	0,13	1,27	1,36
Shapumba	2,23	0,22	5,67	0,45	0,23	0,13	1,25	1,34
San Antonio de Cumbaza	25,35	4,01	1,67	21,96	2,39	0,41	0,00	0,00

CIC: Capacidad de intercambio catiónico; RAS: Relación de adsorción de sodio; PSI: Porcentaje de sodio intercambiable

Tabla 5

Análisis microbiológico de suelos de las zonas de colecta

Área de muestreo de suelo	BT	BE	HT	ACT
	Ufc g ⁻¹ suelo			
Vista Alegre	6,06*	5,05	3,86	4,94
Chontal	5,48	4,51	3,11	4,91
Chirikiyacu	6,23	4,31	4,06	6,06
Aucaloma	5,52	4,47	3,78	5,28
Shapumba	5,52	4,50	3,65	5,61
San Antonio de Cumbaza	6,73	6,23	4,18	6,36

BT: Bacteria totales; BE: Bacterias esporuladas; HT: Hongos totales; ACT: Actinomicetos

* Logaritmo en base 10

2.4 Implementación y conducción del experimento

El trabajo de investigación se realizó en dos fases: Vivero y laboratorio.

Fase de vivero

La primera fase consistió en la multiplicación, selección y aislamiento de BSF con leguminosas de cobertura que se instaló en el vivero del laboratorio de Microbiología Agrícola-Facultad de Ciencias Agrarias – UNSM, Tarapoto (figura 4).



Figura 4. Vista panorámica del vivero para la multiplicación de BSF.

Fase de laboratorio

La siguiente fase fue para el aislamiento, selección, caracterización y evaluación de las BSF, que se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Agrícola “Raúl Ríos Reátegui” (figura 5).



Figura 5. Instalaciones del laboratorio de Microbiología Agrícola.

Generalidades del lugar

a) Ubicación Política:

Sector : Ciudad Universitaria

Distrito : Morales

Provincia : San Martín

Departamento : San Martín

b) Ubicación Geográfica:

Latitud Sur : 06° 35' 00"

Longitud Oeste : 76° 05' 00"

Altitud : 290 m.s.n.m

c) Condiciones climáticas:

Ecosistema : bosque seco pre-montano tropical

Precipitación : 1200 mm/año

Temperatura : Máxima=32°C, Mínima=22°C, Promedio= 26°C

Altitud : 290 m.s.n.m

Humedad relativa: 70%

2.5 Instalación de las leguminosas de cobertura

Los suelos recolectados de las seis zonas de estudio se secaron bajo sombra a temperatura ambiente, para luego ser triturados y tamizados, retirando los restos de plantas, piedras u otro material físico. Para evitar la compactación del suelo en la maceta, se mezcló el suelo en estudio con vermiculita esterilizada a una proporción 1:1 v/v (Rodríguez *et al.*, 2000).



Figura 6. Sustrato suelo: suelo en estudio y vermiculita proporción 1:1

Las macetas con 3,5 kg de sustrato (Suelo en estudio y vermiculita esterilizada (1:1)) fueron sembradas con cuatro leguminosas de cobertura adaptadas a climas tropicales y a condiciones de suelos infértiles como son: puspino (*Cajanus cajan*), canavalia (*Canavalia ensiformes*), crotalaria (*Crotalaria juncea*) y caupi (*Vigna unguiculata*), previamente las semillas fueron desinfectadas. Las leguminosas de cobertura se mantuvieron en condiciones de invernadero por periodo de 60 días, hasta el momento de su cosecha, las cuales fueron regadas a lo largo del día usando agua destilada manteniendo las macetas a capacidad de campo.

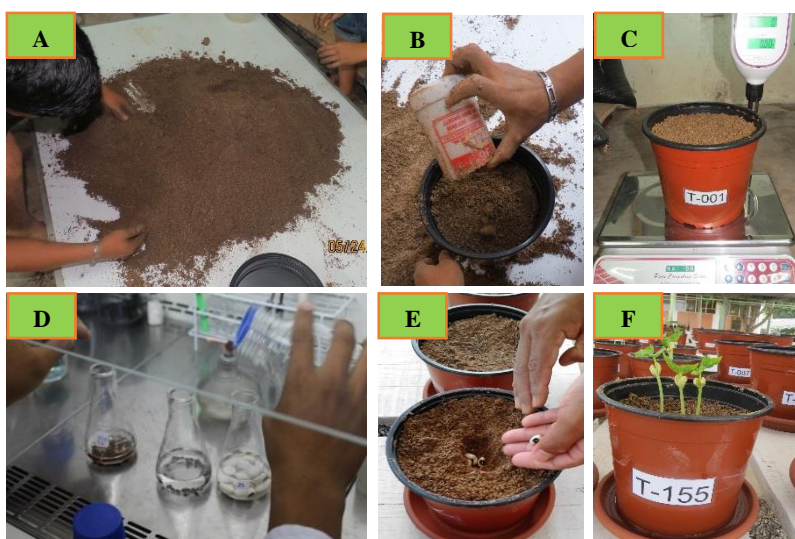


Figura 7. Procedimiento para la instalación de plantas de cobertura: **A)** Preparación del sustrato. **B y C)** Pesado del sustrato en las macetas **D)** Desinfección de las semillas. **E)** Siembra de las semillas de leguminosas. **F)** Leguminosa de cobertura a los 3 días.

2.6 Muestreo y colecta de suelos rizosféricos

Las plantas crecieron en condiciones de invernadero por periodo de 45 días (*Vigna unguiculata*) y 60 días (*Canavalia ensiformis*, *Crotalaria juncea* y *Cajanus cajan*). Finalizado ese periodo se procedió a coleccionar las muestras de suelo rizosférico. El suelo se desprendió de las raíces mediante agitación constante, las raíces de las plantas fueron coleccionadas en bolsas de primer uso, con sus respectivos códigos, para realizar el aislamiento de las BSF.



Figura 8. Plantas de leguminosas a los 60 días: **A)** *Crotalaria juncea*. **B)** *Canavalia ensiformis*. **C)** *Cajanus cajan*. **D)** *Vigna unguiculata*.



Figura 9. Procedimiento para el Muestreo y colecta de suelos rizosféricos: **A)** Retiro de la parte foliar de la planta de leguminosa de cobertura. **B y C)** Desprendimiento de la muestra de suelo rizosférico. **D)** Suelo rizosférico + raíz **E)** Codificación de la muestra extraída.

2.7 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) en suelos rizosféricos

La selección inicial de bacterias solubilizadora de fosfato se realizó mediante un proceso de selección. Las muestras de suelo se procesaron usando el método de siembra en superficie en medio de cultivo GELP, para la cual se utilizó la metodología según Sylvester-Bradley *et al.*, (1982):

Se suspendieron 10 g de suelo rizosférico en 90 ml de solución salina fisiológica estéril (SSFe), transfiriéndose 1 ml de suspensión en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de SSFe y se dispersó en un agitador de tubos por 20 segundos (dilución 1:100), luego se transfirió 1 ml del tubo anterior a otro tubo conteniendo 9 ml de SSFe y se agitó en Vortex (1:1000), donde este último pasó se repitió hasta obtener una dilución de 1:10000 (ver figura 10). Se sembraron 0,1 ml de las 3 últimas diluciones (10^4 , 10^5 y 10^6) en medio de cultivo GELP, suplementado con una fuente insoluble de P (Fosfato ácido de calcio CaHPO_4); (Anexo 1). El pH del medio de cultivo fue ajustado a 7, para finalmente proceder a esterilizar a 121°C por 20 minutos, a una presión de 1 atm.

El inóculo se esparció en la superficie del medio de cultivo con la ayuda del asa de Digrafsky, previamente esterilizada en alcohol etílico de 96°GL , y flameada en mechero Bunsen. Las placas de Petri, se rotularon mediante la siguiente codificación: Suelo, zona, tratamiento, medio de cultivo, fecha y responsable. Posteriormente fueron sellados con Parafilm y se incubaron a temperatura ambiente por aproximadamente 1 semana. Finalmente se seleccionaron las placas de Petri con las diluciones que contengan entre 30 y 300 UFC aisladas que muestren un halo de solubilización del fosfato insoluble (ver figura 10). En esta primera etapa de este proceso de aislamiento, se seleccionaron 132 cepas bacterianas que produjeron la zona clara más amplia basándose en diferencias morfológicas.

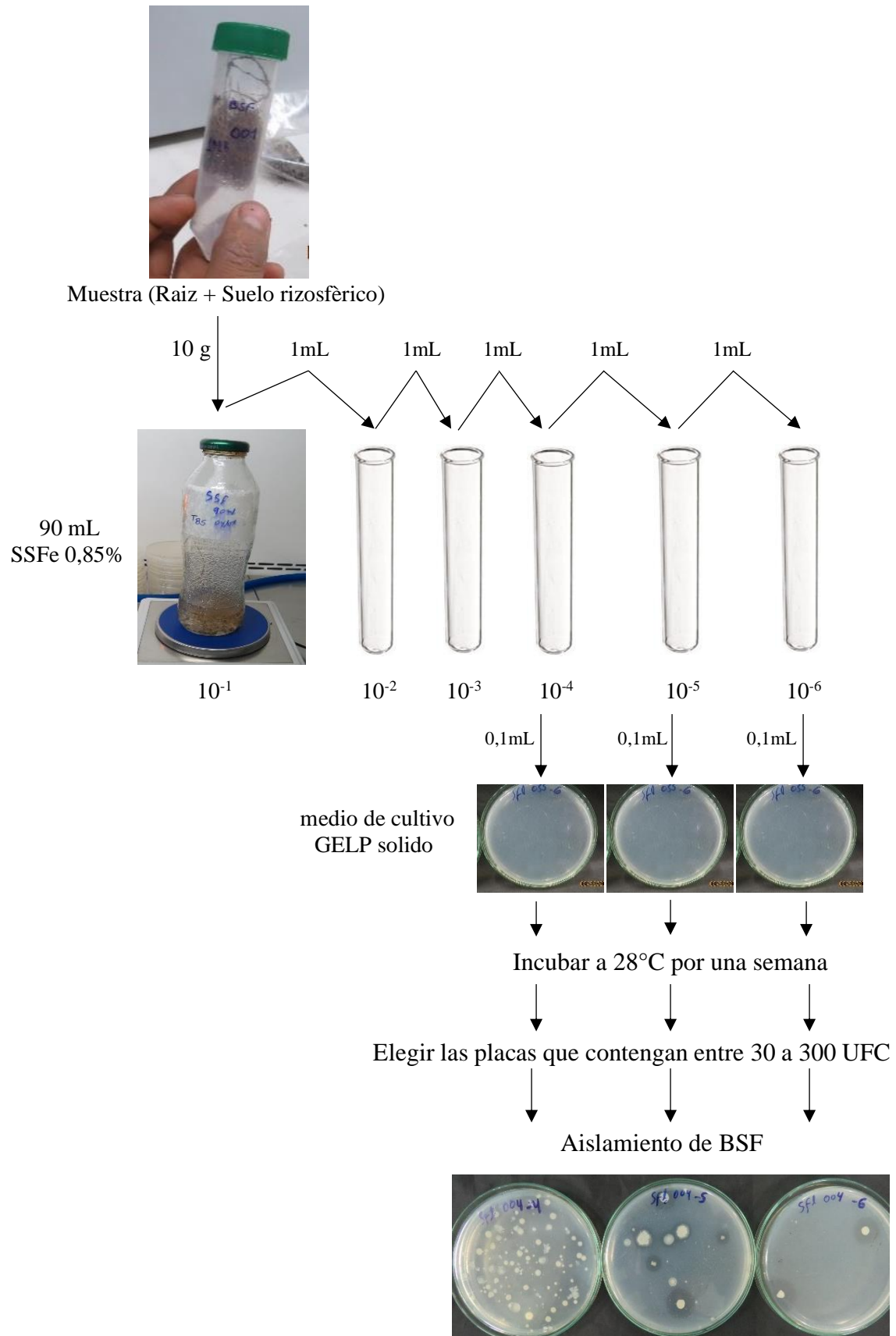


Figura 10. Diluciones para el aislamiento de BSF

2.8 Re aislamiento, purificación y conservación de BSF

Las cepas que mostraron actividad solubilizadora de fosfato, fueron aquellas que formaron un halo translúcido en el medio GELP (figura 11). Estas se repicaron en medio TSA las veces que fueran necesarias, hasta obtener colonias aisladas y con morfologías similares (colonias puras). Las cepas fueron conservadas a corto plazo en cultivos de trabajo, a mediano plazo usando cuñas de TSA conservadas a 4°C y a largo plazo conservadas a -20°C en 30% de glicerol para subsecuentes análisis (Acevedo *et al.*, 2014).

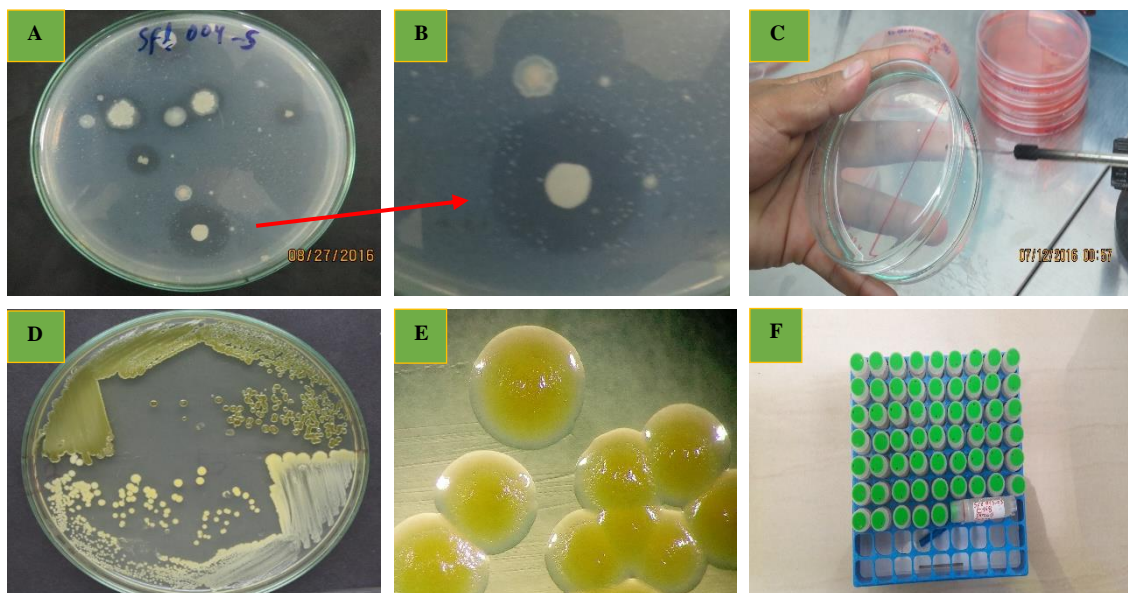


Figura 11. Reaislamiento, purificación y conservación de BSF: **A y B)** Aislamiento y selección de BSF, nótese los halos de solubilización. **C)** Reestriado de las BSF seleccionadas **D)** Cepa reestriado después de los 3 días de incubación. **E)** Cepa o cultivo puro **F)** Conservación a largo plazo a -20°C en 30% de glicerol.

2.9. Caracterización microscópica y morfocolonial de BSF

- Se evaluaron las siguientes características microscópicas (tinción Gram, forma bacteriana, agrupación bacteriana, presencia de esporas) y macroscópicas (forma, elevación, borde, textura, color, consistencia, mucosidad), según Panda *et al.*, 2016.

Procedimiento de tinción Gram

1. Frotis o extensión empleando calor
2. Teñir con cristal violeta (1 min)
3. Lavar con agua destilada
4. Colocar Lugol (1 min)

5. Se bota el Lugol y se decolora con alcohol acetona (15 a 30 seg)
6. Lavar con agua destilada
7. Teñir con safranina x 1 min
8. Lavar con agua destilada
9. Secar la lamina
10. Observar en el microscopio a 100X de aumento empleando aceite de inmersión

2.10. Reactivación de cepas BSF procedentes de leguminosas de cobertura

Las cepas de bacterias rizosféricas de *Vigna unguiculata*, *Canavalia ensiformis*, *Crotalaria juncea* y *Cajanus cajan*, fueron seleccionadas de acuerdo a su potencial de solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ así como por su caracterización microscópica y colonial. Las cepas se reactivaron mediante estriado en superficie en medio TSB sólido. Después de una incubación a 30°C por 48 horas, se procedió a evaluar su pureza y se realizó nuevos cultivos de trabajos en medio TSB sólido (Liu *et al.*, 2015).

2.11. Evaluación cualitativa de la solubilización de fosfatos

2.11.1. Elaboración del pre-inóculo

Las cepas reactivadas (cultivo de trabajo) se inocularon en medio TSB líquido y se incubaron a 30°C por 24 horas a 120 rpm, se ajustaron las suspensiones celulares usando medio TSB líquido estéril hasta alcanzar una $\text{D.O}_{600 \text{ nm}}$ de 0,5.

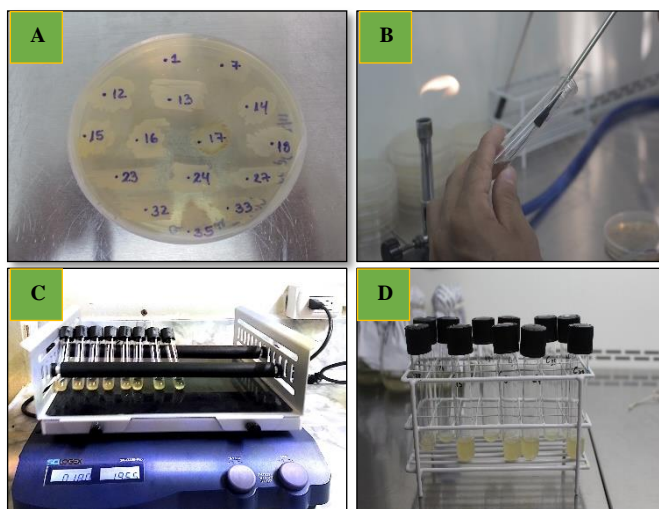


Figura 12. Elaboración del pre inóculo: **A)** Cultivo de trabajo. **B)** Inoculación **C)** Incubación **D)** Pre inóculo.

2.11.2. Preparación de medios de cultivo

Se evaluó la capacidad de solubilización de cuatro fuentes de fosfato insoluble: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , AlPO_4 y FePO_4 .

Los medios de cultivo fueron: Medio Instituto Nacional de Investigación Botánica Fosfato (NBRIP) (Nautiyal *et al.*, 1999) y el Medio Glucosa-Extracto de Levadura Peptona (GELP) (Sylvester y Bradley *et al.*, 1982) (Anexo 02 y 03).

El medio de cultivo conteniendo CaHPO_4 , AlPO_4 y FePO_4 fue el medio GELP, y para el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ se utilizó el medio NBRIP.

2.11.3. Inoculación de placas

Las placas de 9,5 cm de diámetro conteniendo el medio sólido correspondiente, fueron inoculadas en cada uno de los cuatro cuadrantes de una placa de Petri, usando 10 μL de cada cultivo. El tratamiento control fueron los medios suplementado con los fosfatos insolubles, inoculado con medio TSB. Las placas fueron incubadas a 30°C.

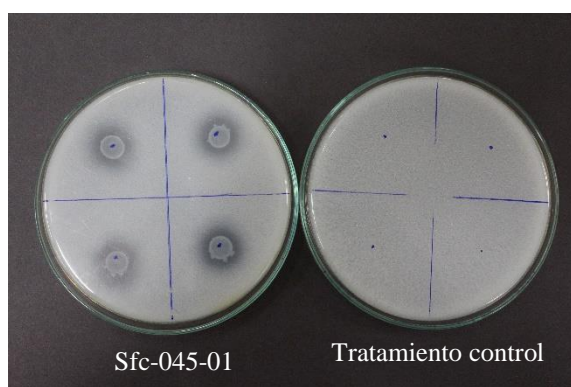


Figura 13. Inoculación en medio NBRIP sólido con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a los 3 días de incubación

2.11.4. Periodo de evaluación

Las evaluaciones se realizaron siguiendo la metodología de Marra *et al.*, (2011). El diámetro del halo de solubilización (área translúcida alrededor de la colonia), así como el diámetro de la colonia, fueron medidos usando un vernier digital desde el tercer día de siembra hasta los 9 días que dura el experimento.

Con estas medidas, se procedió a calcular la eficiencia de solubilización (ESF%), así como el índice de solubilización (IS), a través de las siguientes fórmulas:

$$\text{ESF}\% = (\text{Diámetro de halo de solubilización en mm} / \text{Diámetro de colonia en mm}) \times 100$$

IS= Diámetro de halo de solubilización en mm/diámetro de colonia en mm.

Las cepas fueron categorizadas como:

SOLUBILIZADORAS TEMPRANAS: Cuando la solubilización es antes del tercer día.

SOLUBILIZADORAS TARDÍAS: Cuando la solubilización es después del tercer día, o cuando la solubilización no fue visible hasta después del 9 día.

Basadas en el índice de solubilización las cepas serán clasificadas como:

BAJAS: $IS < 2,00$; **INTERMEDIAS:** $2,00 \leq IS < 4,00$; **ALTAS:** $SI \geq 4,00$.

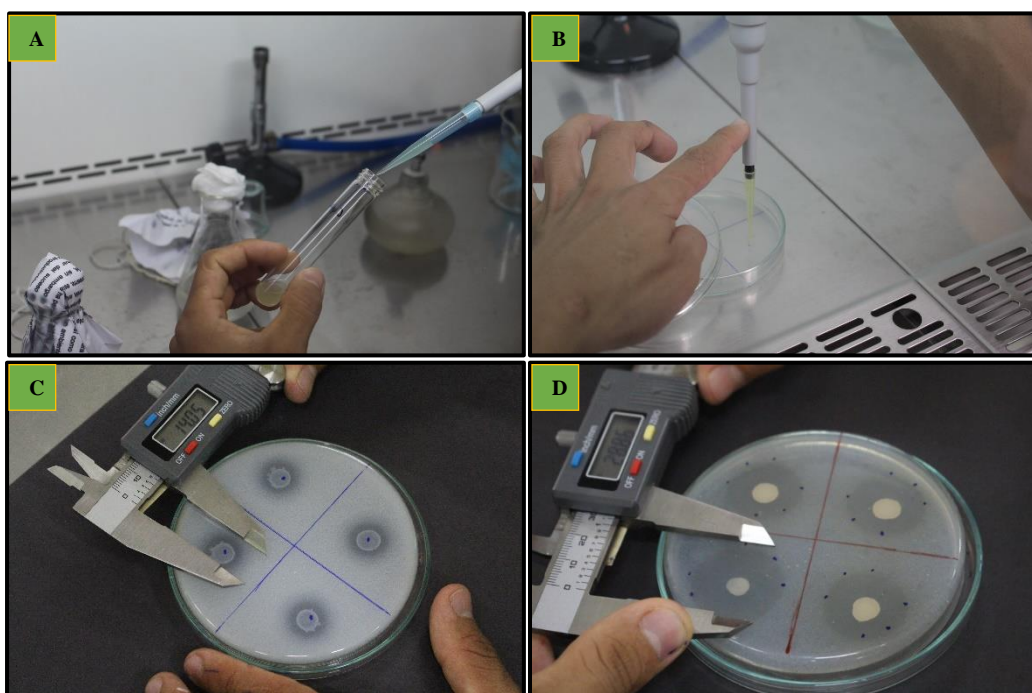


Figura 14. Evaluación cualitativa de la solubilización de fosfatos **A)** y **B)** Inoculación **C)** y **D)** Evaluación

2.12. Evaluación cuantitativa de la solubilización de fosfatos

2.12.1. Elaboración de pre-inóculo

Las cepas reactivadas fueron inoculadas en medio TSB líquido y se incubaron a 30°C por 24 horas, se ajustaron las suspensiones celulares usando medio TSB líquido estéril hasta alcanzar una $D.O_{600 \text{ nm}}$ de 0,5. Como cepa control para la

solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y AlPO_4 se empleará la cepa de *Rhizobium tropici* CIAT 899 de acuerdo a lo reportado por Marra *et al.*, (2011).

2.12.2. Preparación de medios de cultivo

El medio líquido que se utilizó en este ensayo conteniendo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ fue el NBRIP, y el medio conteniendo AlPO_4 e FePO_4 fue el medio GELP.

2.12.3. Inoculación de medios

Se inocularon 0,5 ml del pre inóculo, en 50 ml de caldo GELP o NBRIP cada cepa con tres repeticiones, conteniendo la fuente de fosfato insoluble según corresponda. El cultivo fue incubado a 28°C por 5 días con agitación de 130 rpm.



Figura 15. Inoculación e incubación de los medios de cultivos

2.12.4. Periodo de evaluación

Al finalizar el periodo de evaluación (120 horas), cada muestra fue centrifugada (13000 rpm por 5 minutos) y se guardaron el sobrenadante para estudios posteriores (medición del pH y acidez titulable).

2.12.5. Medición del fosfato soluble

Se siguió la metodología del fosfomolibdato propuesta por Murphy y Riley (1962), para lo cual se tomaron alícuotas de 1200 μL por triplicado del medio de cultivo en crecimiento y fue centrifugado a 13,000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante que contiene el fosfato soluble. En una cubeta se colocaron 120 μL de mezcla reactiva (anexo 3) y se adicionaron 1000 μL de sobrenadante centrifugado, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La formación de una coloración azul fue indicativa de la presencia de fosfatos,

el color fue estable máximo hasta dos horas ver figura 16. La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a 655 nm de longitud de onda.

Los valores de absorbancia fueron interpolados mediante una curva patrón de fosfatos (anexo 04), y se expresaran en $\mu\text{g ml}^{-1}$ o mg L^{-1} .

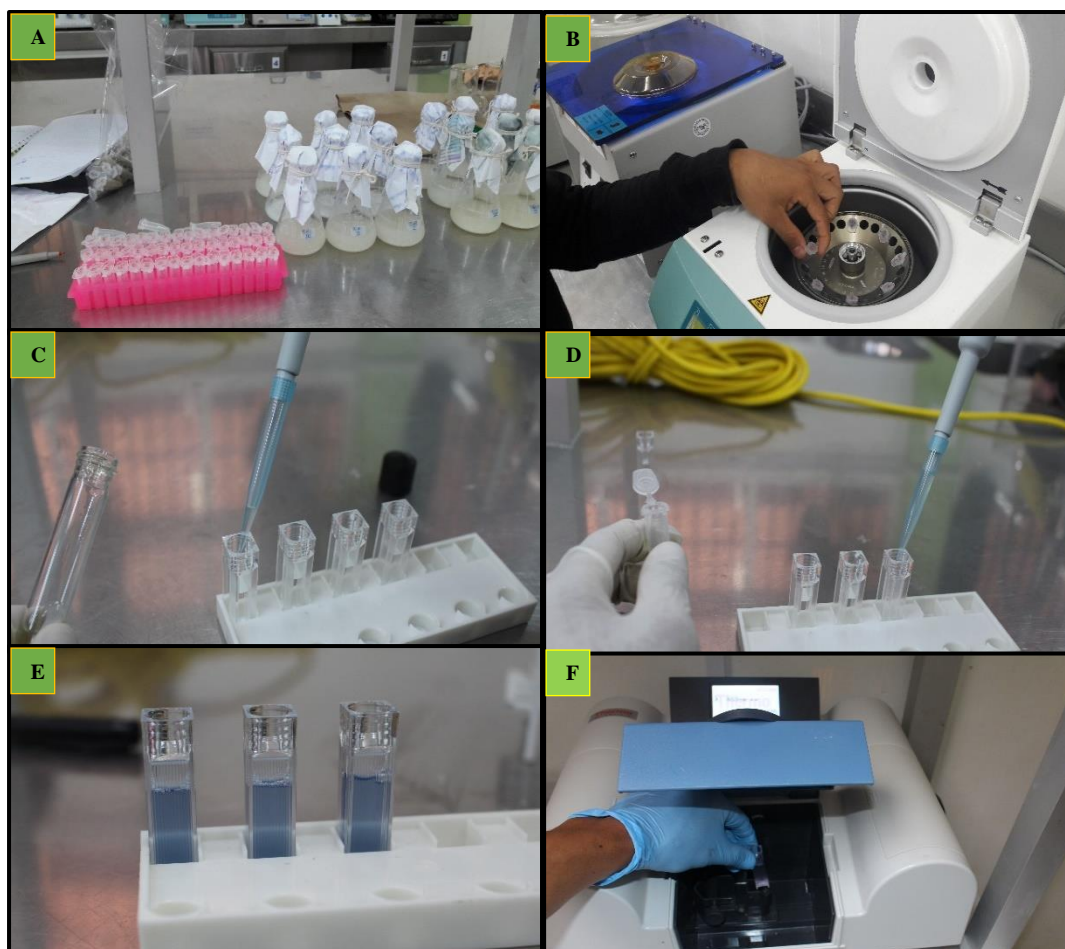


Figura 16. Medición del fosfato soluble. **A)** Alícuotas de 1200 μL por triplicado del medio de cultivo. **B)** Centrifugación a 13,000 rpm por 5 minutos. **C)** y **D)** Adición de 120 μL de mezcla reactiva y 1000 μL de sobrenadante centrifugado. **E)** Presencia de una coloración azul. **F)** Lectura de la absorbancia.

2.13. Preparación de la curva patrón de fosfatos (PO_4)

Para la medición del P soluble se procedió a realizar una curva estándar de PO_4 . Para ello se prepararon una solución de 6 ppm de P (6 mM o 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$) la cual se almacenaron en un frasco oscuro. Esta solución es estable varios meses.

Para la medición del P soluble, se realizó una dilución 1:100 de la solución de 6 ppm (6000 $\mu\text{mol/Litro}$) de KH_2PO_4 para obtener una concentración de 60 $\mu\text{mol/Litro}$. Finalmente se realizaron diluciones dobles, de acuerdo a la Tabla 6.

Tabla 6

Modo de preparación de soluciones estandarizadas para curva patrón

Tubo	Solución	Agua desionizada	Concentración ($\mu\text{mol P/Litro}$) ó ($\mu\text{g P/Litro}$)
1	2 ml Solución trabajo	2 ml	30
2	2 ml Solución 1	2 ml	15
3	2 ml Solución 2	2 ml	7,5
4	2 ml Solución 3	2 ml	3,75
5	2 ml Solución 4	2 ml	1,88
6	2 ml Solución 5	2 ml	0,94
7	2 ml Solución 6	2 ml	0,47

2.14. Medición del pH y acidez titulable en sobrenadante

Se midió el pH en 2 ml de sobrenadante usando un medidor de pH, después de cada muestreo. Para medir la acidez titulable, se colocaron 2 gotas de una solución de indicador fenolftaleína (0,1%) en 5 ml de sobrenadante y se tituló usando NaOH 0,01N, la acidez titulable fue expresada como ácido tartárico (g L^{-1}) (Panda *et al.*, 2016).

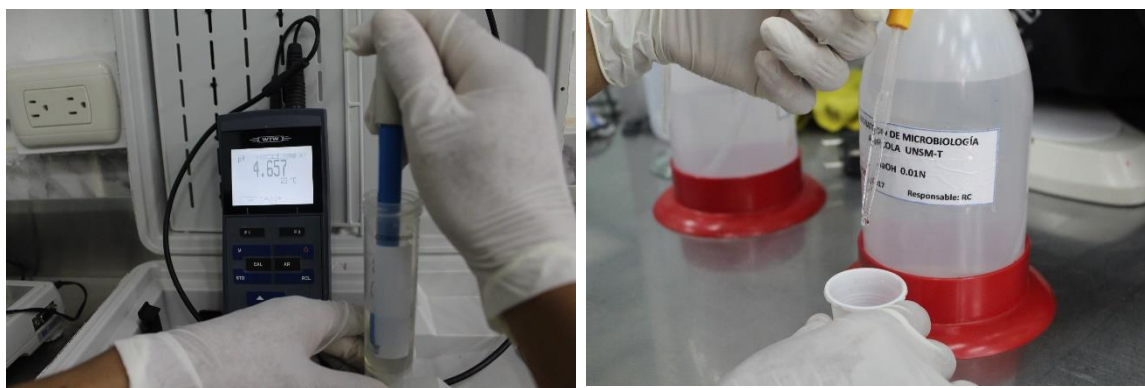


Figura 17. Medición de pH y acidez titulable del sobrenadante del medio del cultivo.

2.15. Diseño de investigación

Para la evaluación cualitativa y cuantitativa a fin de determinar la eficiencia de solubilización se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). El número de tratamientos se determinó en función del número de bacterias aisladas y purificadas, obteniendo 46 tratamientos incluyendo los tratamientos como el control positivo y absoluto (ver tabla 7). Todas las cepas bacterianas fueron evaluadas en 4 fuentes de

fosfatos insolubles (CaHPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 y FePO_4) para la evaluación cualitativa y 3 fuentes de fosfatos insolubles ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 y FePO_4) para la evaluación cuantitativa.

2.16. Análisis estadístico

2.16.1. Prueba de normalidad, desviación estándar y determinación del error estándar

Todos los experimentos fueron desarrollados en triplicado para evaluar la reproducibilidad y los resultados fueron expresados como valores medios. Así se determinarán la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks, así como la desviación estándar y el error estándar experimental.

2.16.2. Análisis de varianza

Los resultados fueron analizados estadísticamente por un análisis de varianza, coeficientes de correlación (r) y probados mediante el test de Duncan ($p < 0,01$).

Tabla 7

Tratamientos en estudio para la evaluación de la solubilización de fosfatos insolubles

TRATAMIENTOS			
	Cepas		Cepas
T01	Sfc-021-01	T24	Sfcv-098-02
T02	Sfc-045-01	T25	Sfcv-129-01
T03	Sfc-077-05	T26	Sfcv-137-08
T04	Sfc-077-06	T27	Sfcv-201-01
T05	Sfc-093-02	T28	Sfp-048-04
T06	Sfc-093-04	T29	Sfp-063-10
T07	Sfc-102-01	T30	Sfp-071-02
T08	Sfc-102-02	T31	Sfp-160-01
T09	Sfc-159-01	T32	Sfcr-003-02
T10	Sfc-054-01-2	T33	Sfcr-028-01
T11	Sfc-054-02	T34	Sfcr-043-01
T12	Sfc-070-04	T35	Sfcr-043-02
T13	Sfc-133-01	T36	Sfcr-059-02
T14	Sfc-141-02	T37	Sfcr-091-06
T15	Sfcv-001-01	T38	Sfcr-099-01
T16	Sfcv-001-07	T39	Sfcr-099-02
T17	Sfcv-017-03	T40	Sfcr-116-01
T18	Sfcv-041-01-2	T41	Sfcr-116-02
T19	Sfcv-041-9	T42	Sfcr-116-03
T20	sfcv-082-06	T43	Sfcr-123-01
T21	Sfcv-082-11	T44	Sfcr-131-09
T22	Sfcv-089-01	T45	Fosfato sin cepa
T23	Sfcv-098-01	T46	CIAT-899

Control absoluto: Fosfato sin cepa; Control positivo: CIAT-899

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento, purificación y conservación de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF).

Para el aislamiento de las BSF se seleccionaron colonias individuales morfológicamente distintas que presentaron un halo de solubilización alrededor de la colonia, creciendo en el medio GELP suplementado con CaHPO_4 como se muestra en la figura 18. Se aislaron y purificaron 132 aislamientos procedentes de la rizósfera de *Vigna unguiculata*, *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria juncea* (35, 19, 37 y 41 cultivos puros respectivamente). Las colonias fueron reagrupadas y se escogió una cepa representante de cada morfología, indistintamente del suelo de procedencia. De esta manera solo fueron seleccionadas 14 cepas de *V. unguiculata*, 13 cepas de *C. ensiformis*, 4 cepas de *C. cajan*, y 13 cepas de *Crotalaria juncea*. Las cepas seleccionadas fueron depositadas en la colección de cultivos del Laboratorio de Microbiología Agrícola “Raúl Ríos Reátegui” de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto, con sus respectivos códigos, para su almacenamiento a largo plazo y próximos estudios.

Durante más de medio siglo, la formación de un halo de solubilización formado alrededor de una colonia microbiana creciendo en agar suplementado con fosfato mineral insoluble, ha servido como un indicador universal para la solubilización de fosfato, aunque en los últimos años ha sido discutido (Bashan *et al.*, 2013).

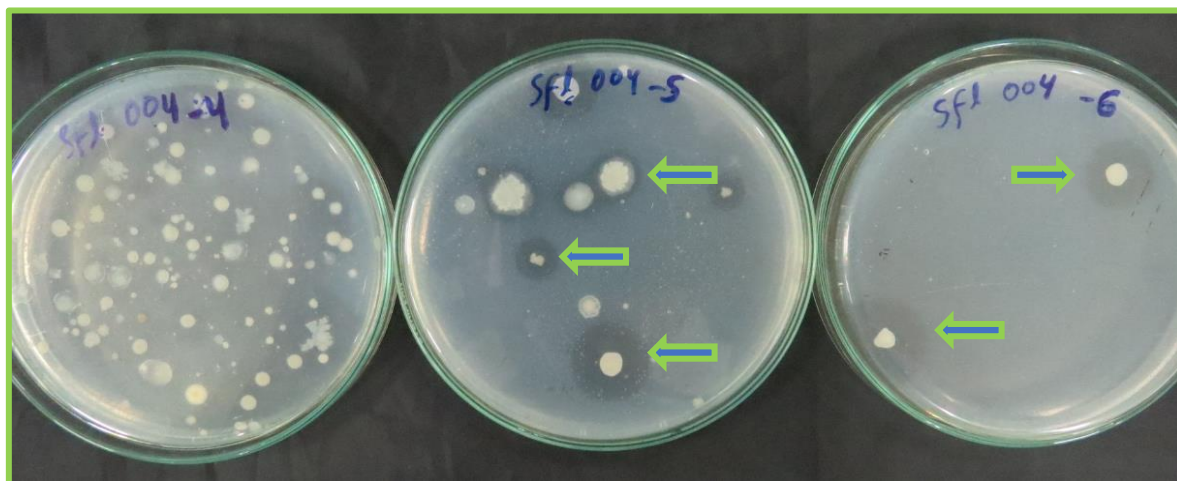


Figura 18. Aislamiento de BSF en Agar GELP. Las flechas indican el crecimiento de colonias capaces de solubilizar fosfato mineral insoluble a través de la formación de un halo de solubilización.

Tabla 8

Procedencia de las cepas de bacterias rizosféricas con actividad de solubilización de fosfato insoluble aisladas de rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la subcuenca del Cumbaza

Leguminosas	Zonas de estudio						Total
	Chirikyacu	Vista Alegre	Chontal	San Antonio	Shapumba	Aucaloma	
<i>Vigna unguiculata</i>	Sfc-021-01	Sfc-054-01-2	Sfc-045-01	Sfc-133-01	Sfc-102-01	Sfc-077-05	14
		Sfc-054-02	Sfc-159-01	Sfc-141-02	Sfc-102-02	Sfc-077-06	
		Sfc-070-04				Sfc-093-02	
						Sfc-093-04	
<i>Canavalia ensiformis</i>	Sfcv-001-01	-	Sfcv-041-01-2	Sfcv-129-01		Sfcv-082-06	13
	Sfcv-001-07		Sfcv-041-9	Sfcv-137-08	Sfcv-098-01	Sfcv-082-11	
	Sfcv-017-03			Sfcv-201-01	Sfcv-098-02	Sfcv-089-01	
<i>Cajanus cajan</i>	-	Sfp-063-10 Sfp-071-02	Sfp-048-04 Sfp-160-01	-	-	-	4
<i>Crotalaria juncea</i>	Sfcr-003-02	Sfcr-059-02	Sfcr-028-01	Sfcr-123-01	Sfcr-099-01	Sfcr-091-06	13
			Sfcr-043-01	Sfcr-131-09	Sfcr-099-02		
			Sfcr-043-02		Sfcr-116-01		
					Sfcr-116-02 Sfcr-116-03		
Total	5	6	9	7	9	8	44

Un mayor número de cepas fueron obtenidas de la rizósfera de *Vigna unguiculata* (14 cepas) a diferencia del número de aislamientos procedentes de la rizósfera de *Cajanus cajan* (4 cepas) (Ver Tabla 8.). Las diferencias en la frecuencia de aislamientos entre las distintas leguminosas, se debe a que cada planta presenta un perfil de exudados radicales diferentes, lo que permite atraer distintas comunidades microbianas, constituyendo a la rizósfera como una zona “exclusiva” de alimentación e interacción que influyen en el crecimiento de las plantas (Iyer *et al.*, 2017). Se ha demostrado que las poblaciones de BSF procedente de suelos rizosféricos son considerablemente más altas en comparación con suelos no rizosféricos y son metabólicamente más activas que otras fuentes (Khan *et al.*, 2009; Behera *et al.*, 2014; Selvi *et al.*, 2017). Motivo por el cual, las rizósferas de leguminosas seleccionadas en el presente trabajo, pueden considerarse una fuente importante para el aislamiento de bacterias nativas con capacidad de solubilizar fosfatos minerales insolubles y adaptados a condiciones de suelos particulares.

El aislamiento de BSF en suelos ácidos, ha sido reportado por Panda *et al.*, (2016) quienes realizaron el aislamiento de BSF procedentes de la rizósfera de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Zingiber officinale* y *Amomum subulatum* cultivadas en suelos ácidos de la región oriental del Himalaya, Sikkim-India. Los autores reportan que existen escasos reportes sobre el aislamiento de BSF en suelos ácidos procedentes de regiones tropicales y con capacidad de solubilización de fosfatos en condiciones de temperatura sub-óptimas. De igual forma, Pradhan *et al.*, (2017) investigaron la solubilización de fosfatos de Ca, Al, y Fe por bacterias nativas en suelos ácidos de Odisha (India), estos autores resaltan la importancia de seleccionar microbios beneficiosos nativos de la zona, que se encuentran adaptados al entorno climático local. Por otro lado, Marra *et al.* (2012) aislaron bacterias endófitas nativas solubilizadoras de fosfatos de suelos tropicales utilizando la leguminosa *Vigna unguiculata* como planta trampa.

Este trabajo constituye el primer reporte de aislamiento de BSF mineral insoluble procedente de la rizósfera de leguminosas de cobertura en suelos ácidos degradados de la región tropical de Perú.

3.2. Caracterización morfocolonial de los aislamientos



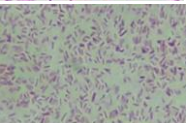

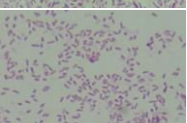
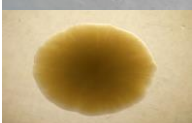
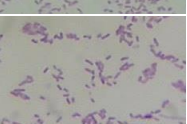

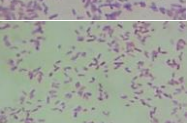
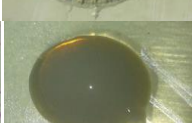
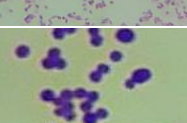

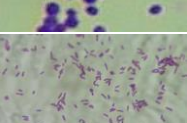
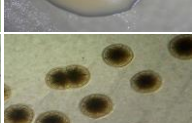
Se observaron morfologías coloniales diversas en los 44 aislamientos de BSF, la forma bacilar fue la morfología más común, seguido de los cocos. Así mismo, los resultados de la reacción de Gram determinaron que las bacterias de forma bacilar fueron Gram negativas (93%), y las que tuvieron forma de cocos fueron Gram positivas (7%) (Sfc-093-04, Sfcv-098-02 y Sfcr-003-02). Las dimensiones de las colonias y datos relacionados a la caracterización microscópica y morfocolonial se muestran en la tabla 9.

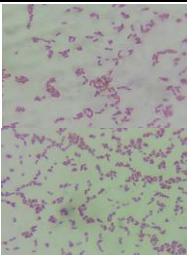
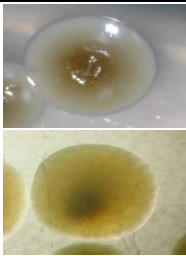
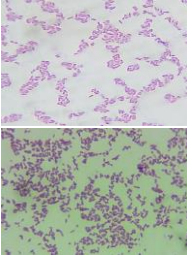

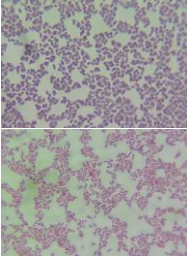

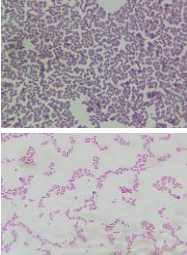
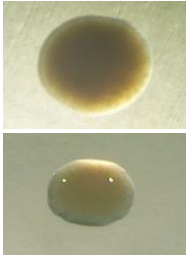


Varios autores han reportado la presencia de bacterias Gram negativas, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* y *Flavobacterium*, inclusive del filo Actinobacteria como *Arthrobacter*, *Mycobacterium* y *Micrococcus* en la rizósfera de leguminosas (Toro *et al.*, 2013; Selvi *et al.*, 2017). Trabajos anteriores también han documentado que en la rizósfera de leguminosas tropicales, la abundancia de bacterias Gram negativas a comparación de las bacterias Gram positivas, es mayor (Toro *et al.*, 2013; Rfaki *et al.*, 2014).

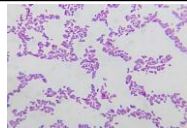

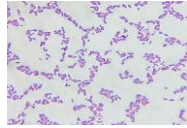
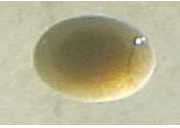
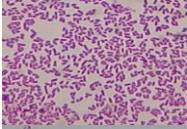



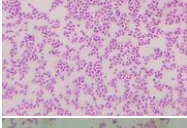
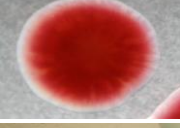
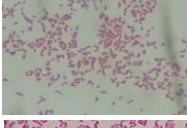
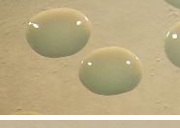
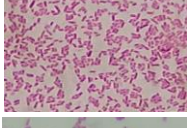
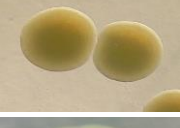


Toro *et al.*, (2013) reportó que las rizósfera de las plantas especialmente de las leguminosas contienen complejas comunidades de bacterias, entre ellas *Pseudomonas*, los que se encuentran muy comúnmente dentro de estos ecosistemas gracias a metabolismo enormemente versátil que les permite crecer en todo tipo de entornos. Ellos reportaron el aislamiento de la cepa *Pseudomonas guariconensis* PCAVU11 en el curso de un estudio de BSF que se encontró en suelos rizosféricos de *Vigna unguiculata* en el estado de Guárico, Venezuela. Donde a través de la secuencia del gen 16S rRNA tenía un 99,2% de similitud con *Pseudomonas*. La cepa PCAVU11 fue Gram negativa, en forma de bacilo y móvil por medio de dos flagelos polares, las células crecieron como colonias translúcidas de color beige (crema) sobre agar nutritivo. Estas características morfocoloniales se relaciona con lo encontrado con una gran parte de las cepas aisladas en este trabajo (ver tabla 9) encontrándose colonias en su mayoría translúcidas (70,5%) de color crema (75%) sobre el agar nutritivo presentando una tinción Gram negativas con formas de bacilos.

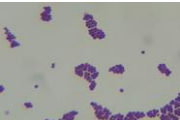

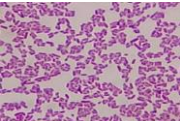
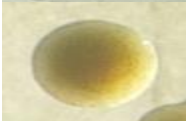
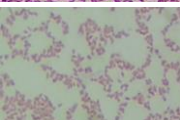

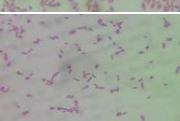


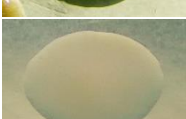
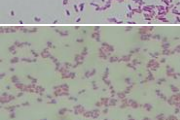
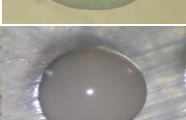
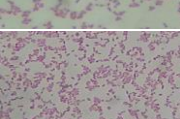
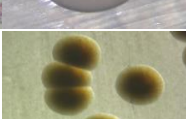
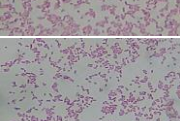
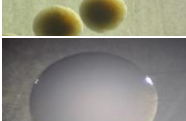
Tabla 9.

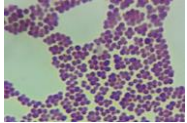
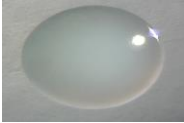
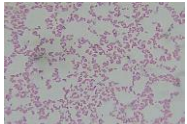
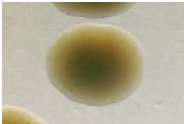
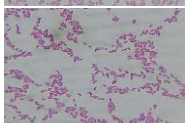
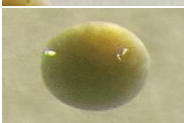
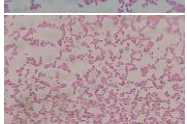
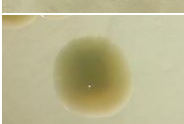
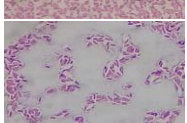

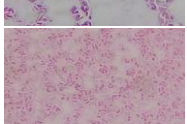
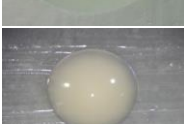
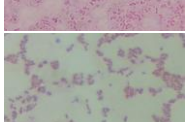
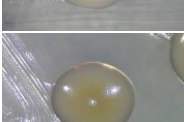
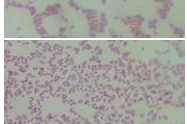

Caracterización morfocolonial de aislamientos de BSF mineral insoluble procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura tropicales creciendo en suelos degradados de la sub-cuenca alta y media del Cumbaza-San Martín-Perú

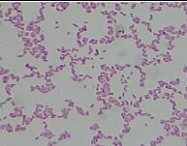
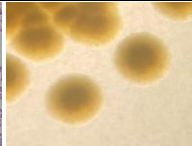
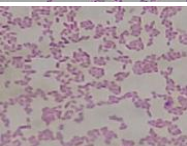
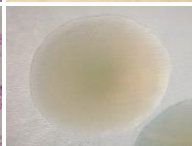
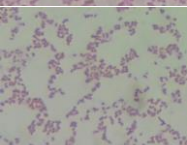

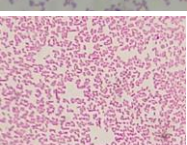
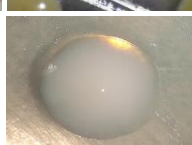
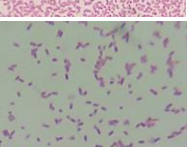
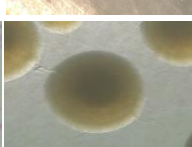
Código de aislamiento	Características microscópicas			Características macroscópicas									Detalles fotográficos de colonias	
	Procedencia	Reacción Gram	Forma	Diámetro colonia (mm)	Color	Superficie	Características ópticas	Elevación	Forma	Borde	Consistencia	Elasticidad del moco		
Sfc-021-01	CHRI-C	-	bacilo	1.16	Crema	Li	OP	C	Ci	En	Cre	-		
Sfc-045-01	CHO-C	-	bacilo	2.54	Crema	Li	Trans	P	Ci	En	Cre	-		
Sfc-077-05	AUCA-A	-	bacilo	2.37	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfc-077-06	AUCA-A	-	bacilo	1.44	Crema	Li	OP	P	Ci	En	Cre	-		
Sfc-093-02	AUCA-C	-	bacilo	1.22	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfc-093-04	AUCA-C	+	Coco	0.99	naranja	Li	OP	P	Ci	En	Cre	-		
Sfc-102-01	SHA-A	-	bacilo	1.92	Crema	Li	Trl	C	Ci	En	Cre	-		

Código de aislamiento	Características microscópicas			Características macroscópicas									Detalles fotográficos de colonias	
	Procedencia	Reacción Gram	Forma	Diámetro colonia (mm)	Color	Superficie	Características ópticas	Elevación	Forma	Borde	Consistencia	Elasticidad del moco		
Sfc-102-02	SHA-A	-	bacilo	1.61	Verde oscuro	Li	OP	C	Ci	En	Cre	-		
Sfc-159-01	CHO-A	-	bacilo	2.15	Crema	Li	Trans	P	Ci	En	Cre	-		
Sfc-054-01-2	VIS-A	-	bacilo	0.83	Marron	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfc-054-02	VIS-A	-	bacilo	2.17	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfc-070-04	VIS-C	-	bacilo	1.04	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfc-133-01	SAN-B	-	bacilo	1	Crema	Ru	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfc-133-06	SAN-C	-	bacilo	1.31	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfcv-001-01	Chiri-A	-	bacilo	0.82	Crema	Li	Trl	C	Ci	En	Cre	-		

Código de aislamiento	Características microscópicas			Características macroscópicas									Detalles fotográficos de colonias	
	Procedencia	Reacción Gram	Forma	Díámetro colonia (mm)	Color	Superficie	Características ópticas	Elevación	Forma	Borde	Consistencia	Elasticidad del moco		
Sfcv-001-07	Chiri-A	—	bacilo	0.93	Blanco	Li	OP	P	Ci	En	Cre	—		
Sfcv-017-03	Chiri-C	—	bacilo	0.9	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	—		
Sfcv-041-01-2	CHO-C	—	bacilo	3.86	Marron	Li	Trl	P	Fu	L	Cre	—		
Sfcv-041-9	CHO-C	—	bacilo	1.39	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	—		
Sfcv-082-06	AUCA-B	—	bacilo	1.24	Rojo	Li	OP	C	Ci	En	Cre	—		
Sfcv-086-11	AUCA-B	—	bacilo	1.48	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	—		
Sfcv-089-01	AUCA-C	—	bacilo	1.67	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	—		
Sfcv-098-01	SHA-A	—	bacilo	1.37	Verde	Li	OP	P	Ci	En	Cre	—		

Código de aislamiento	Características microscópicas			Características macroscópicas									Detalles fotográficos de colonias	
	Procedencia	Reacción Gram	Forma	Diámetro colonia (mm)	Color	Superficie	Características ópticas	Elevación	Forma	Borde	Consistencia	Elasticidad del moco		
Sfcv-098-02	SHA-A	+	Coco	1.08	amarillo-nar:	Li	OP	P	Ci	En	Cre	-		
Sfcv-129-01	SAN-B	-	bacilo	0.87	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfcv-137-08	SAN-C	-	bacilo	1.57	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfcv-201-01	SHA-C	-	bacilo	1.18	Verde	Li	OP	P	Ci	En	Cre	-		
Sfp-048-04	VIS-C	-	bacilo con cápsula	1.39	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfp-063-10	VIS-B	-	bacilo	1.12	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfp-071-02	VIS-C	-	bacilo	0.95	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfp-160-01	CHO-A	-	bacilo	0.75	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		

Código de aislamiento	Características microscópicas			Características macroscópicas									Detalles fotográficos de colonias	
	Procedencia	Reacción Gram	Forma	Diámetro colonia (mm)	Color	Superficie	Características ópticas	Elevación	Forma	Borde	Consistencia	Elasticidad del moco		
Sfcr-003-02	CHIRI-A	+	Coco	0.38	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfcr-028-01	CHO-A	-	bacilo	1.14	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfcr-043-01	CHO-C	-	bacilo	2.88	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfcr-043-02	CHO-C	-	bacilo	1.05	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfcr-059-02	VIS-B	-	bacilo con cápsula	0.92	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfcr-091-06	AUCA-C	-	bacilo	1.16	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		
Sfcr-099-01	SHA-A	-	bacilo	1.38	Verde	Li	OP	P	Ci	En	Cre	-		
Sfcr-099-02	SHA-A	-	bacilo	1.91	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-		

Código de aislamiento	Características microscópicas			Características macroscópicas									Elasticidad del moco	Detalles fotográficos de colonias	
	Procedencia	Reacción Gram	Forma	Diámetro colonia (mm)	Color	Superficie	Características ópticas	Elevación	Forma	Borde	Consistencia				
Sfcr-116-01	SHA-C	-	bacilo	1.26	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-			
Sfcr-116-02	SHA-C	-	bacilo	1.15	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-			
Sfcr-116-03	SHA-C	-	bacilo	1.05	Verde	Li	OP	C	Ci	En	Cre	-			
Sfcr-123-01	SAN-A	-	bacilo	0.82	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-			
Sfcr-131-02	SAN-B	-	bacilo	0.77	Crema	Li	Trl	P	Ci	En	Cre	-			

Reacción Gram: +. Gram positivas, -, Gram negativas; **Diámetro de colonia:** Diámetro alcanzado a los 7 días de incubación; **Superficie- Li:** Lisa, **Ru:** Rugosa; **Características ópticas en luz transmitida, OP:** Opaca no permite la entrada de la luz, **Trl:** Traslúcida, deja pasar la luz sin permitir completa visibilidad a través de la colonia, **Trans:** Transparente, deja pasar la luz permitiendo observar objetos a través de la colonia; **Elevación - P:** Plana, **C:** Convexa; **Forma - Ci:** Redonda, **Fu:** Fusiforme; **Borde - En:** Entero, **L:** Lobulado; **Consistencia - Cre:** Cremosa; **Elasticidad del moco, +:** Presente, -: Ausente.

3.3. Evaluación cualitativa de la solubilización de fosfatos por BSF

En medio sólido, el 80% de los aislados seleccionados son reportados como solubilizadores, al menos en una fuente de fosfato, el otro 20% crecieron en los medios con fosfato insoluble pero no hubo indicios de solubilización. A diferencia de las cepas solubilizadoras de fosfatos de calcio (CaHPO_4 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), solo el 9,1% presentó indicios de solubilización de AlPO_4 , mientras que ninguna cepa mostró indicios de solubilización para FePO_4 (ver tabla 10). Resultados similares, han sido reportados por Marra *et al.* (2012) y Costa *et al.* (2016), demostrando que estos resultados se deben posiblemente a la selección inicial de estas BSF con medios suplementados solamente con fosfatos de calcio, mas no con fosfatos de Al y Fe. De esa manera, Bashan *et al.*, (2013) considera a los medios suplementados con calcio como un factor inadecuado para la selección universal de BSF, considerando que las fuentes de fosfatos de calcio, aunque es un fosfato potencialmente insoluble, no es difícil de disolver, en comparación con otros fosfatos más recalcitrantes como el FePO_4 y AlPO_4 .

3.3.1. Índice de solubilización del P (ISP)

El ISP de los aislamientos en evaluación para CaHPO_4 , estuvo en el rango de 1,31 (bajo) a 5,23 (alto), de 1,28 (bajo) a 2,97 (intermedio) para $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y de 1,48 (bajo) a 2,42 (intermedio) para AlPO_4 (ver tabla 10). Los aislamientos Sfc-054-01-2 y Sfc-102-02 mostraron los mayores ISP, de 5,23 y 5,06 respectivamente en CaHPO_4 , incluso valores más altos que lo observado por Marra *et al.*, (2012) que solo encontraron ISP de bajo a intermedio (1,04 a 3,55), así como Costa *et al.*, (2016) que también encontraron un ISP de bajo a intermedio (1,21 a 3,54). Mientras que los aislamientos Sfc-133-01 y Sfc-099-01 mostraron un ISP intermedio de 2,97 y 2,95 respectivamente en $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Estos valores son inferiores a lo reportado por Rfaki *et al.*, (2014), quienes reportaron ISP de intermedio (2,51) a alto (6,00) en bacterias aisladas de la rizósfera de leguminosas nativas creciendo en suelos agrícolas de la región de Meknes, Marruecos. En relación a las cepas que solubilizaron AlPO_4 , el ISP obtenido vario de bajo a intermedio (1,48-2,42), estos valores fueron superiores a los reportados por Costa *et al.*, (2016) en cepas que solubilizaron AlPO_4 (1,20) y Marra *et al.*, (2012) que encontraron valores bajos (1,03) e intermedios (2,03) de ISP.

Tabla 10

Índice de solubilización del P (ISP) por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín

CEPA	CaHPO ₄	Ca ₃ (PO ₄) ₂	AlPO ₄	FePO ₄
CIAT 899	CNS	CNS	CNS	CNS
Sfc-021-01	3,45	1,50	CNS	CNS
Sfc-045-01	3,37	1,94	CNS	CNS
Sfc-077-05	CNS	CNS	CNS	CNS
Sfc-077-06	2,36	1,60	CNS	CNS
Sfc-093-02	1,59	1,43	CNS	CNS
Sfc-093-04	CNS	NC	CNS	CNS
Sfc-102-01	2,61	1,60	CNS	CNS
Sfc-102-02	5,06	2,09	CNS	CNS
Sfc-159-01	CNS	CNS	CNS	CNS
Sfc-054-01-2	5,23	2,39	CNS	CNS
Sfc-054-02	CNS	CNS	CNS	CNS
Sfc-070-04	1,34	1,50	CNS	CNS
Sfc-133-01	4,05	2,97	CNS	CNS
Sfc-141-02	CNS	CNS	CNS	CNS
Sfcv-001-01	1,50	1,27	CNS	CNS
Sfcv-001-07	2,16	1,95	CNS	CNS
Sfcv-017-03	1,49	1,28	CNS	CNS
Sfcv-041-01-2	3,03	1,99	CNS	CNS
Sfcv-041-9	1,31	1,39	CNS	CNS
sfcv-082-06	CNS	1,46	CNS	CNS
Sfcv-082-11	1,42	CNS	CNS	CNS
sfcv-089-01	1,52	1,54	CNS	CNS
Sfcv-098-01	3,00	2,49	CNS	CNS
Sfcv-098-02	CNS	NC	CNS	CNS
Sfcv-129-01	CNS	CNS	CNS	CNS
Sfcv-137-08	3,00	2,50	1,64	CNS
Sfcv-201-01	3,78	2,66	CNS	CNS
Sfp-048-04	1,85	1,70	CNS	CNS
Sfp-063-10	3,33	2,45	CNS	CNS
Sfp-071-02	1,70	1,69	CNS	CNS
Sfp-160-01	1,66	1,67	CNS	CNS
Sfcr-003-02	CNS	NC	CNS	CNS
Sfcr-028-01	1,57	1,40	CNS	CNS
Sfcr-043-01	3,94	2,27	2,42	CNS
Sfcr-043-02	1,55	1,40	CNS	CNS
Sfcr-059-02	2,25	1,35	1,48	CNS
Sfcr-091-06	3,88	2,24	CNS	CNS
Sfcr-099-01	4,14	2,95	2,04	CNS
Sfcr-099-02	1,64	1,40	CNS	CNS
Sfcr-116-01	1,50	1,39	CNS	CNS
Sfcr-116-02	1,44	1,60	CNS	CNS
Sfcr-116-03	3,79	2,32	CNS	CNS
Sfcr-123-01	1,71	1,39	CNS	CNS
Sfcr-131-09	1,47	1,41	CNS	CNS

(CIAT 899) Control positivo; (CNS) Crecieron, pero no solubilizaron; (NC) No crecieron; ISP = diámetro del halo (mm) / diámetro de la colonia (mm), evaluado a final de incubación.

3.3.2. Eficiencia de la solubilización de fosfato ácido de calcio (CaHPO_4) y fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

El análisis de varianza muestra diferencias estadísticamente altamente significativas en la eficiencia de solubilización (ES) de CaHPO_4 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en las cepas evaluadas. Así mismo el coeficiente de variabilidad fue 11,67% y 5,86%, respectivamente y el coeficiente de determinación R^2 fue de 99 % para ambos fosfatos insolubles (ver tabla 11 y 12) y la prueba de Duncan permitió discriminar tres y cuatro grupos que solubilizan CaHPO_4 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ respectivamente.

Tabla 11

Análisis de varianza para la eficiencia de solubilización de fosfato ácido de calcio (CaHPO_4)

Fuente de variabilidad	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.C	P - Valor Sig.
Cepa	34	2900991,60	85323,28	147,82	0,0001 **
Error	70	40403,60	577,169		
Total	104	2941395,20			

** : Altamente significativo a $P < 0,01$

C.V= 11,67% **R²= 99%**

Tabla 12

Análisis de varianza para la eficiencia de solubilización de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Fuente de variabilidad	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.C	P - Valor Sig.
Cepa	34	526472,35	15484,48	154,35	< 0,0001 **
Error	70	7022,28	100,32		
Total	104	533494,63			

** : Altamente significativo a $P < 0,01$

C.V= 5,86% **R²= 99%**

La tabla 13 resalta que la cepa Sfc-054-01-2 alcanzó la mayor ES al final de la evaluación (noveno día) en medio suplementado con CaHPO_4 (523,48%), el cual estadísticamente no se diferenció de la cepa Sfc-102-02 (505,75%). En los aislamientos Sfc-077-05, Sfc-093-04, Sfc-159-01, Sfc-054-02, Sfc-141-02, Sfcv-082-06, Sfcv-098-02, Sfcv-129-01, Sfc-003-02 incluyendo el control positivo (CIAT-899) no hubo ES ya que crecieron en el medio con fosfato insoluble, pero no apareció el halo de solubilización característico. Por otro lado, la tabla 14 muestra que la cepa Sfc-133-01 alcanzó la mayor ES al final de la evaluación (noveno día) en medio suplementado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (296,95 %), el cual estadísticamente no se diferenció de la cepa Sfc-099-01 (294,81%). En los aislamientos Sfc-077-05, Sfc-159-01, Sfc-054-02, Sfc-141-02, Sfcv-129-01, incluyendo el control positivo (CIAT-899) no hubo ES, sin embargo presentaron crecimiento sobre el medio de cultivo.

Resultados similares han sido obtenidos por otros autores, Panda *et al.* (2016) al evaluar 26 cepas de bacterias aisladas de la rizósfera de *Zea mays* (7), *Oryza sativa* (8), *Zingiber officinale* (6) y *Amomum subulatum* (5) encontraron una alta eficiencia de solubilización en $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en medio sólido NBRIP en el rango de 46 a 160%, de igual manera Manzoor *et al.*, (2016) estudiaron la ESF por bacterias aisladas de la rizósfera de *Zea mays* en medio sólido Pikovskaya (PVK) suplementado $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ donde obtuvieron una ES de 94,1 a 269%.

Tabla 13

Eficiencia de la solubilización de CaHPO₄ en tres diferentes tiempos, realizado por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín

Cepa	Leguminosa/ Origen	CaHPO ₄		
		3d	6d	9d
CIAT 899	<i>Phaseolus vulgaris</i> /Palmira-Colombia.	CNS	CNS	CNS
Sfc-021-01	<i>V. unguiculata</i> /Chiri-C	229,15 (± 4,57)fg B	295,08 (± 7,64)g A	344,8 (± 24,43)cd A
Sfc-045-01	<i>V. unguiculata</i> /Cho-C	177,05 (± 9,63)jk C	252,72 (± 13,88)h B	337,23 (± 19,12)cde A
Sfc-077-05	<i>V. unguiculata</i> /Auca-A	CNS	CNS	CNS
Sfc-077-06	<i>V. unguiculata</i> /Auca-A	246,00 (± 12,08)ef A	249,03 (± 13,02)hi A	235,56 (± 0,63)gh A
Sfc-093-02	<i>V. unguiculata</i> /Auca-A	158,61 (± 3,45)klmn A	158,96 (± 2,39)kl A	159,28 (± 2,70)jk A
Sfc-093-04	<i>V. unguiculata</i> /Auca-C	CNS	CNS	CNS
Sfc-102-01	<i>V. unguiculata</i> /Sha-A	182,53 (± 5,61)ij B	255,89 (± 11,40)h A	260,82 (± 9,01)fg A
Sfc-102-02	<i>V. unguiculata</i> /Sha-A	288,88 (± 21,61)ab B	438,46 (± 34,08)a A	505,75 (± 46,59)a A
Sfc-159-01	<i>V. unguiculata</i> /Cho-A	CNS	CNS	CNS
Sfcv-054-01-2	<i>V. unguiculata</i> /Vis-A	242,85 (± 2,97)ef C	406,16 (± 15,32)b B	523,48 (± 27,23)a A
Sfc-054-02	<i>V. unguiculata</i> /Vis-A	CNS	CNS	CNS
Sfc-070-04	<i>V. unguiculata</i> /Vis-C	139,92 (± 2,79)no A	144,05 (± 6,71)l A	134,36 (± 6,39)k A
Sfc-133-01	<i>V. unguiculata</i> /San-B	245,08 (± 0,72)ef C	324,15 (± 1,20)def B	405,28 (± 6,48)b A
Sfc-141-02	<i>V. unguiculata</i> /San-C	CNS	CNS	CNS
Sfcv-001-01	<i>C. ensiformis</i> /Chiri-A	150,00 (± 7,76)mno A	CNS	CNS
Sfcv-001-07	<i>C. ensiformis</i> /Chiri-A	293,37 (± 5,32)a A	222,38 (± 3,76)ij B	216,48 (± 6,18)hi B
Sfcv-017-03	<i>C. ensiformis</i> /Chiri-C	149,02 (± 7,21)mno A	CNS	CNS
Sfcv-041-01-2	<i>C. ensiformis</i> /Chon-C	195,97 (± 0,41)hi C	242,72 (± 3,57)hi B	303,25 (± 8,58)def A
Sfcv-041-9	<i>C. ensiformis</i> /Chon-C	131,28 (± 3,58)o A	CNS	CNS
sfcv-082-06	<i>C. ensiformis</i> /Auca-B	CNS	CNS	CNS
Sfcv-082-11	<i>C. ensiformis</i> /Auca-B	141,53 (± 0,53)no A	CNS	CNS
sfcv-089-01	<i>C. ensiformis</i> /Auca-C	151,77 (± 6,17)lmn A	151,62 (± 6,18)l A	CNS
Sfcv-098-01	<i>C. ensiformis</i> /Sha-A	234,88 (± 2,52)f B	294,87 (± 1,54)g A	299,79 (± 4,68)ef A

Cepas	Leguminosa/ Origen	CaHPO ₄		
		3d	6d	9d
Sfcv-098-02	<i>C. ensiformis</i> /Sha-A	CNS	CNS	CNS
Sfcv-129-01	<i>C. ensiformis</i> /San-B	CNS	CNS	CNS
Sfcv-137-08	<i>C. ensiformis</i> /San-C	209,90 (± 5,22)h B	237,85 (± 15,65)hij B	299,85 (± 18,16)ef A
Sfcv-201-01	<i>C. ensiformis</i> /San-C	272,60 (± 9,26)bc C	332,12 (± 3,93)de B	378,48 (± 6,26)bc A
Sfp-048-04	<i>C. cajan</i> /Cho-C	166,69 (± 4,57)jklm B	185,19 (± 2,99)k A	185,19 (± 2,99)ij A
Sfp-063-10	<i>C. cajan</i> /Vis-B	245,26 (± 6,13)ef C	303,20 (± 8,74)fg B	333,14 (± 5,06)de A
Sfp-071-02	<i>C. cajan</i> /Vis-C	174,48 (± 5,89)jk A	171,30 (± 6,83)kl A	170,16 (± 8,68)jk A
Sfp-160-01	<i>C. cajan</i> /Cho-A	170,74 (± 4,02)jkl A	172,67 (± 4,11)kl A	165,81 (± 0,74)jk A
Sfcr-003-02	<i>C. juncea</i> /Chiri-A	CNS	CNS	CNS
Sfcr-028-01	<i>C. juncea</i> /Cho-A	CNS	157,38 (± 1,73)kl A	CNS
Sfcr-043-01	<i>C. juncea</i> /Cho-C	261,88 (± 8,07)cde C	359,83 (± 8,76)c B	394,03 (± 7,89)e A
Sfcr-043-02	<i>C. juncea</i> /Cho-C	CNS	155,21 (± 3,87)kl A	CNS
Sfcr-059-02	<i>C. juncea</i> /Vis-B	CNS	211,77 (± 3,67)j B	224,51 (± 1,72)ghi A
Sfcr-091-06	<i>C. juncea</i> /Auca-C	212,24 (± 7,79)gh B	316,37 (± 12,67)efg A	388,25 (± 43,01)b A
Sfcr-099-01	<i>C. juncea</i> /Sha-A	267,52 (± 5,86)cd C	360,89 (± 1,04)c B	414,31 (± 5,68)b A
Sfcr-099-02	<i>C. juncea</i> /Sha-A	CNS	163,51 (± 1,39)kl A	CNS
Sfcr-116-01	<i>C. juncea</i> /Sha-C	CNS	149,70 (± 5,85)l A	CNS
Sfcr-116-02	<i>C. juncea</i> /Sha-C	CNS	143,54 (± 2,91)l A	CNS
Sfcr-116-03	<i>C. juncea</i> /Sha-C	248,71 (± 5,22)def C	351,01 (± 5,37)cd B	379,10 (± 5,83)bc A
Sfcr-123-01	<i>C. juncea</i> /San-A	CNS	171,07 (± 7,51)kl A	CNS
Sfcr-131-09	<i>C. juncea</i> /San-B	164,43 (± 3,44)jklm A	147,02 (± 9,64)l A	147,02 (± 9,64)jk A
CV (%)		6,68	7,42	11,67

Validado mediante la prueba de rango múltiple de Duncan con un 95% de probabilidad. Las medias representadas por la misma letra no son significativamente diferentes, las letras mayúsculas indican diferencias en el tiempo y la letra minúscula indica diferencias entre cepas. Los datos indicados anteriormente son valores promedio de tres repeticiones ± error estándar de la media.

Tabla 14

Eficiencia de la solubilización $Ca_3(PO_4)_2$ en tres diferentes tiempos, realizado por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín

Cepa	Leguminosa/ Origen	$Ca_3(PO_4)_2$		
		3d	6d	9d
CIAT 899	<i>Phaseolus vulgaris</i> /Palmira-Colombia.	CNS	CNS	CNS
Sfc-021-01	<i>V. unguiculata</i> /Chiri-C	126,47 (\pm 2,71)p B	155,98 (\pm 2,75)ijkl A	150,31 (\pm 1,74)hijk A
Sfc-045-01	<i>V. unguiculata</i> /Cho-C	193,25 (\pm 3,85)bc A	192,21 (\pm 4,82)fg A	194,29 (\pm 4,16)f A
Sfc-077-05	<i>V. unguiculata</i> /Auca-A	CNS	CNS	CNS
Sfc-077-06	<i>V. unguiculata</i> /Auca-A	CNS	CNS	160,40 (\pm 2,74)gh A
Sfc-093-02	<i>V. unguiculata</i> /Auca-A	144,31 (\pm 2,73)ijklm B	164,19 (\pm 5,75)hij A	142,62 (\pm 3,80)hijkl B
Sfc-093-04	<i>V. unguiculata</i> /Auca-C	NC	NC	NC
Sfc-102-01	<i>V. unguiculata</i> /Sha-A	CNS	CNS	159,71 (\pm 5,14)ghi A
Sfc-102-02	<i>V. unguiculata</i> /Sha-A	156,64 (\pm 2,19)fgh C	195,91 (\pm 1,89)f B	209,11 (\pm 3,17)ef A
Sfc-159-01	<i>V. unguiculata</i> /Cho-A	CNS	CNS	CNS
Sfc-054-01-2	<i>V. unguiculata</i> /Vis-A	178,74 (\pm 5,16)d B	220,67 (\pm 7,59)cd A	239,21 (\pm 7,76)cd A
Sfc-054-02	<i>V. unguiculata</i> /Vis-A	CNS	CNS	CNS
Sfc-070-04	<i>V. unguiculata</i> /Vis-C	145,51 (\pm 3,00)hijkl A	150,14 (\pm 3,10)ijkl A	150,28 (\pm 2,61)hijk A
Sfc-133-01	<i>V. unguiculata</i> /San-B	215,49 (\pm 6,61)a C	262,29 (\pm 8,59)a B	296,65 (\pm 6,58)a A
Sfc-141-02	<i>V. unguiculata</i> /San-C	CNS	CNS	CNS
Sfcv-001-01	<i>C. ensiformis</i> /Chiri-A	127,39 (\pm 3,60)op A	CNS	CNS
Sfcv-001-07	<i>C. ensiformis</i> /Chiri-A	159,38 (\pm 5,14)fg B	176,61 (\pm 6,82)gh AB	195,19 (\pm 4,13)f A
Sfcv-017-03	<i>C. ensiformis</i> /Chiri-C	127,25 (\pm 3,47)op A	127,79 (\pm 3,41)m A	127,92 (\pm 3,39)l A
Sfcv-041-01-2	<i>C. ensiformis</i> /Chon-C	174,26 (\pm 2,21)d B	207,76 (\pm 3,42)def A	199,26 (\pm 2,68)f A
Sfcv-041-9	<i>C. ensiformis</i> /Chon-C	139,02 (\pm 1,99)jklmno A	CNS	CNS
sfcv-082-06	<i>C. ensiformis</i> /Auca-B	145,91 (\pm 1,53)hl A	CNS	CNS
Sfcv-082-11	<i>C. ensiformis</i> /Auca-B	CNS	CNS	CNS
sfcv-089-01	<i>C. ensiformis</i> /Auca-C	CNS	154,04 (\pm 7,11)ijkl A	154,04 (\pm 7,11)ghij A
Sfcv-098-01	<i>C. ensiformis</i> /Sha-A	171,03 (\pm 3,96)de B	222,94 (\pm 7,47)cd A	249,03 (\pm 10,48)bc A

Cepa	Leguminosa/ Origen	Ca ₃ (PO ₄) ₂		
		3d	6d	9d
Sfcv-098-02	<i>C. ensiformis</i> /Sha-A	NC	NC	NC
Sfcv-129-01	<i>C. ensiformis</i> /San-B	CNS	CNS	CNS
Sfcv-137-08	<i>C. ensiformis</i> /San-C	158,46 (± 3,81)fg C	208,61 (± 5,30)def B	250,29 (± 4,99)bc A
Sfcv-201-01	<i>C. ensiformis</i> /San-C	202,80 (± 0,82)b C	245,63 (± 5,14)ab B	265,80 (± 2,97)b A
Sfp-048-04	<i>C. cajan</i> /Cho-C	141,78 (± 2,13)jklmn B	168,36 (± 3,20)hi A	169,66 (± 5,91)g A
Sfp-063-10	<i>C. cajan</i> o/Vis-B	190,29 (± 9,45)c B	231,89 (± 10,20)bc A	245,30 (± 10,99)c A
Sfp-071-02	<i>C. cajan</i> /Vis-C	148,46 (± 2,84)ghijk A	161,59 (± 14,74)hi A	169,14 (± 7,97)gh A
Sfp-160-01	<i>C. cajan</i> /Cho-A	145,47 (± 2,20)hijkl B	156,32 (± 3,30)hi AB	166,95 (± 5,34)ghij A
Sfcr-003-02	<i>C. juncea</i> /Chiri-A	NC	NC	NC
Sfcr-028-01	<i>C. juncea</i> /Cho-A	126,27 (± 2,26)p A	138,38 (± 3,56)lm A	140,03 (± 5,35)jkl A
Sfcr-043-01	<i>C. juncea</i> /Cho-C	149,98 (± 2,72)fghij C	201,85 (± 4,89)ef B	226,66 (± 3,02)d A
Sfcr-043-02	<i>C. juncea</i> /Cho-C	125,91 (± 8,32)p A	144,02 (± 7,82)klm A	140,2 (± 11,13)jkl A
Sfcr-059-02	<i>C. juncea</i> /Vis-B	137,55 (± 2,94)klmnop B	160,56 (± 5,72)hijk A	134,76 (± 4,26)kl B
Sfcr-091-06	<i>C. juncea</i> /Auca-C	155,67 (± 1,24)fghi B	216,94 (± 4,18)cde A	224,41 (± 5,86)de A
Sfcr-099-01	<i>C. juncea</i> /Sha-A	190,96 (± 3,33)c C	257,80 (± 4,71)a B	294,81 (± 8,58)a A
Sfcr-099-02	<i>C. juncea</i> /Sha-A	128,78 (± 0,89)p B	133,71 (± 2,46)lm B	140,40 (± 0,67)kl A
Sfcr-116-01	<i>C. juncea</i> /Sha-C	129,89 (± 3,45)nop A	145,48 (± 9,86)ijkl A	139,39 (± 10,19)jkl A
Sfcr-116-02	<i>C. juncea</i> /Sha-C	136,08 (± 5,32)lmnop B	165,64 (± 7,24)hi A	159,67 (± 8,45)ghi AB
Sfcr-116-03	<i>C. juncea</i> /Sha-C	161,67 (± 2,55)ef B	214,93 (± 7,05)cde A	232,45 (± 5,34)cd A
Sfcr-123-01	<i>C. juncea</i> /San-A	141,40 (± 1,37)jklmn B	156,34 (± 3,48)ijkl A	139,31 (± 1,32)jkl B
Sfcr-131-09	<i>C. juncea</i> /San-B	132,40 (± 2,48)mnop B	160,89 (± 2,31)hjik A	140,87 (± 3,16)ijkl B
CV (%)		4,56	6,36	5,86

Validado mediante la prueba de rango múltiple de Duncan con un 95% de probabilidad. Los medios representados por la misma letra no son significativamente diferentes. Las letras mayúsculas indican diferencias en el tiempo y la letra minúscula indica diferencias entre cepas. Los datos indicados anteriormente son valores promedio de tres repeticiones ± error estándar de la media.

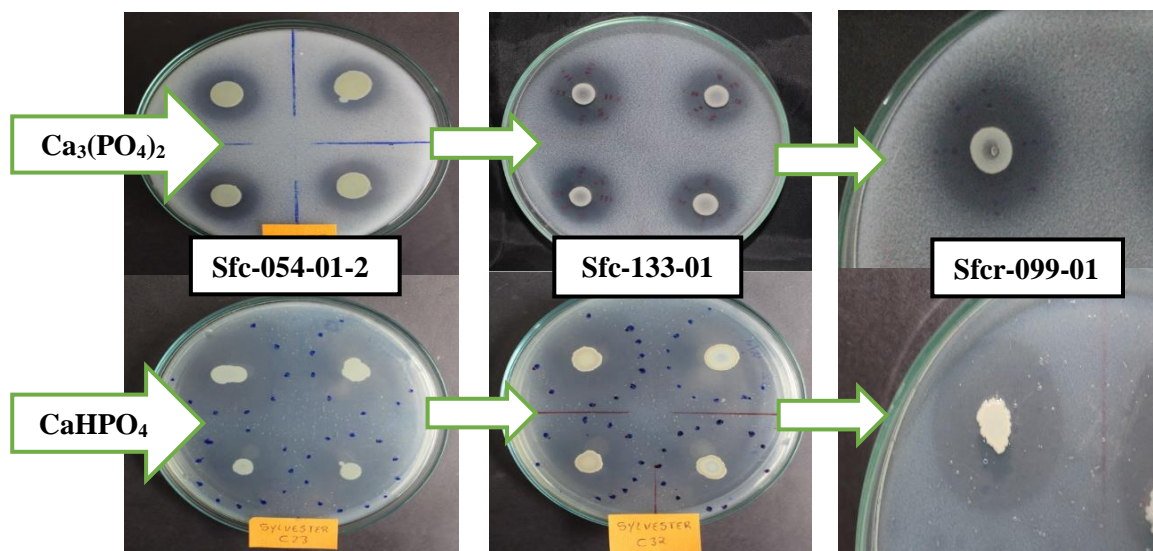


Figura 19. Solubilización de dos fuentes de fosfatos de calcio con mayor ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y menor (CaHPO_4) nivel de insolubilidad por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín.

De acuerdo al inicio de solubilización, el 68% y el 73% de las cepas presentaron una solubilización temprana (< 3 días) para CaHPO_4 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, respectivamente. Las cepas solubilizadoras de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Sfc-077-06, Sfc-102-01 y sfcv-089-01. Así como, Sfc-028-01, Sfc-043-02, Sfc-099-02, Sfc-116-01 y Sfc-123-01 solubilizadoras de CaHPO_4 fueron clasificadas como tardías (>3 días) (ver figuras 20 y 21). De igual manera Costa *et al.*, (2016) aislaron 26 cepas de BSF, donde el 42,3% presentó una solubilización temprana, estando dentro de ellas la cepa que obtuvo la mayor ESF (354). Resultado similar reportó Marra *et al.*, (2011) con la cepa LMG 1222 que tuvo el mayor ESF (251), donde la solubilización también se dio antes del tercer día de incubación.

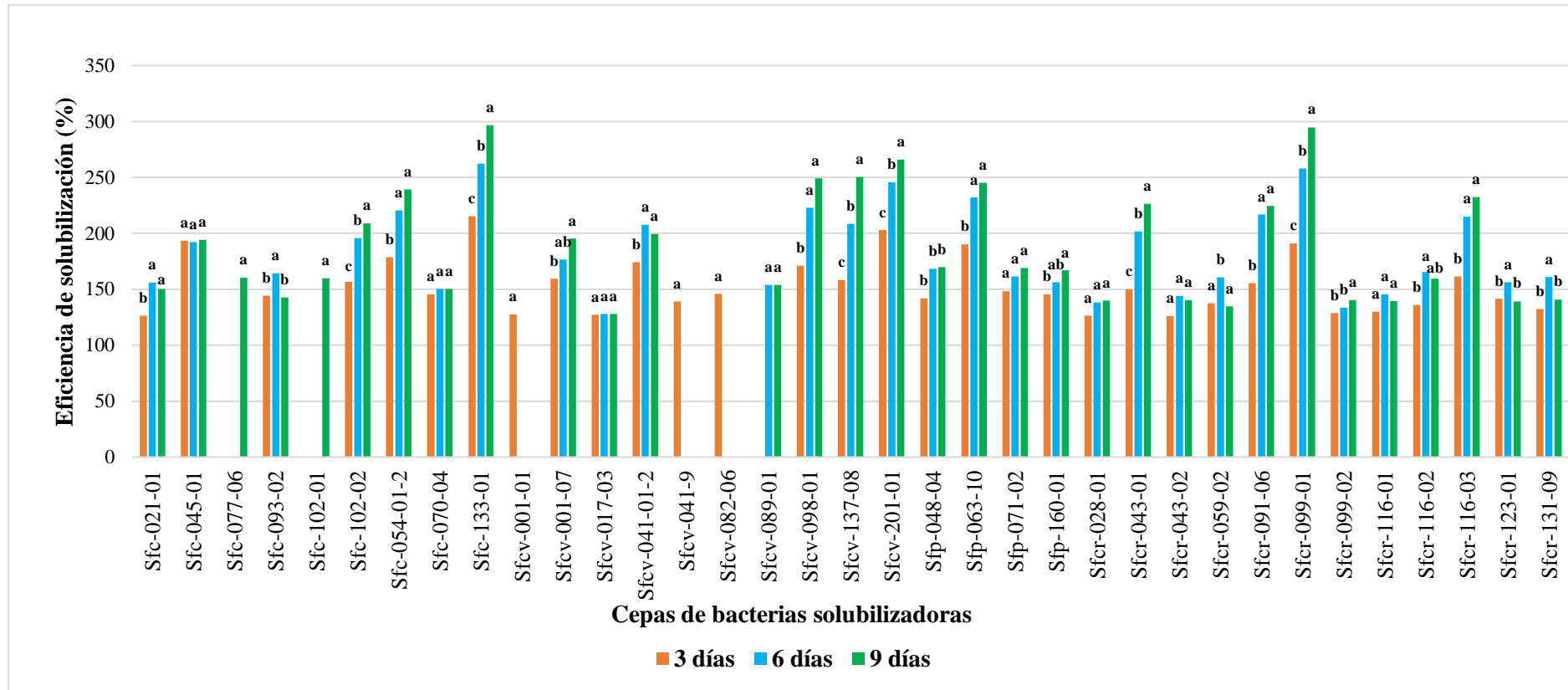


Figura 20. Eficiencia de la solubilización de fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, durante tres periodos de evaluación por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín. Las letras en las barras corresponden a la prueba de medias de Duncan ($p < 0,01$), en cada periodo. Las letras diferentes son significativamente diferentes entre sí.

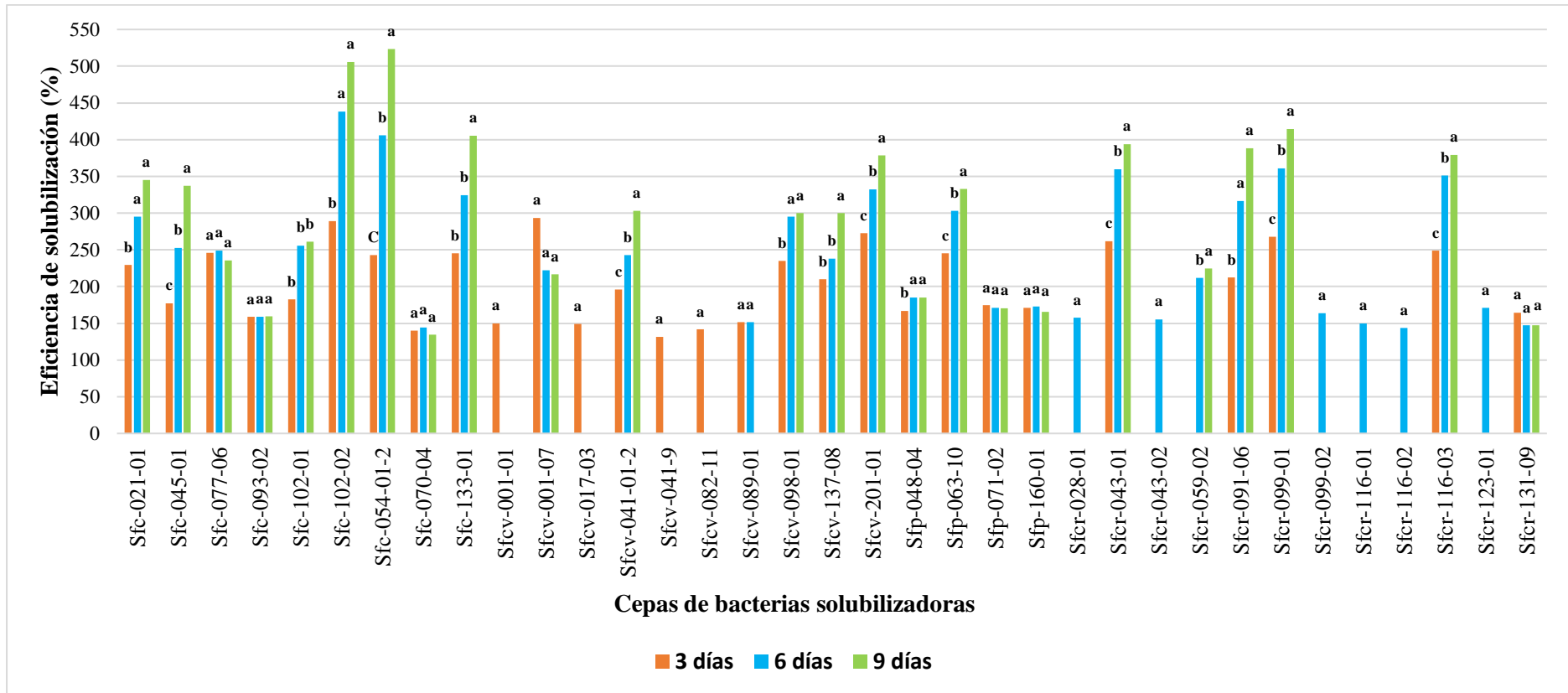


Figura 21. Eficiencia de la solubilización de fosfato ácido de calcio (CaHPO_4), durante los tres periodos de evaluación por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín. Las letras en las barras corresponden a la prueba de medias de Duncan ($p < 0,01$), en cada periodo. Las letras diferentes son significativamente diferentes entre sí.

3.3.3. Eficiencia de la solubilización de fosfato de aluminio (AlPO₄) y fosfato de hierro (FePO₄)

La tabla 16 muestra que el 9,09% de las cepas en estudio tuvieron la capacidad de solubilizar AlPO₄, y ninguna de las cepas fue capaz de solubilizar FePO₄ en medio GELP sólido. Resultados similares reportaron Marra *et al.*, (2012) y Costa *et al.*, (2016).

El análisis de varianza muestra diferencias estadísticas altamente significativa en la ESF de las cuatro cepas que demuestra que las cepas tienen diferentes capacidades solubilizadoras de Al ($p \leq 0,01$). Así mismo el coeficiente de variabilidad fue 7,23 % y el coeficiente de determinación R² fue de 90 % (tabla 15).

El aislamiento que alcanzó la mayor ES fue la Sfcr-043-01 (241,80%), el cual estadísticamente se diferenció de las cepas Sfcr-099-01 (204,46), Sfcv-137-08 (164,67) y Sfcr-059-02 (148,05).

Tabla 15

Análisis de varianza para la eficiencia de solubilización de AlPO₄

Fuente de variabilidad	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.C	P - Valor Sig.
Cepa	3	21295,29	7098,43	37,81	< 0,0001 **
Error	12	2252,95	188		
Total	15	23548,24			

** : Altamente significativo a $P < 0,01$

C.V= 7,23%

R²= 90%

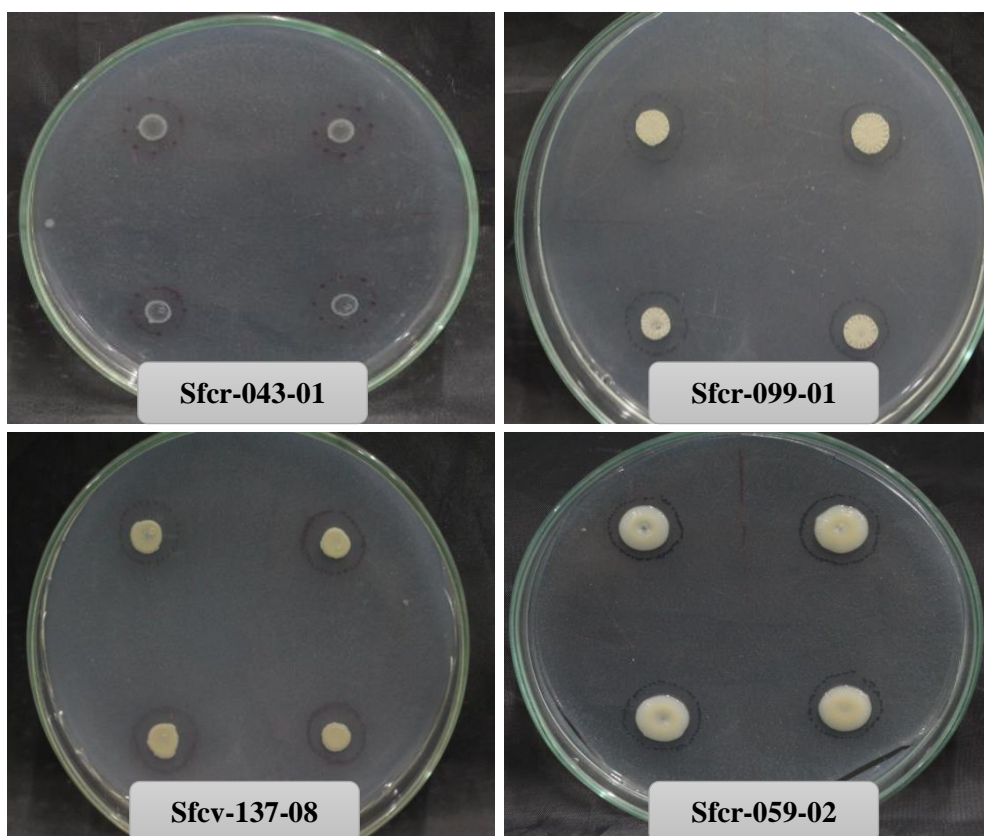


Figura 22. Halos de solubilización producidos por los aislamientos que solubilizaron AlPO_4 .

Las cuatro cepas que solubilizaron AlPO_4 tuvieron una solubilización tardía. Mostrándose la formación del halo poco visible a partir del octavo día, por lo que se le evaluó la ESF a los doce días de incubación (figura 22 y tabla 16), de igual manera Costa *et al.*, (2016) de las 26 cepas que aislaron solo una cepa solubilizo AlPO_4 , con una solubilización tardía a partir de los 12 días.

La eficiencia de la solubilización de fosfato (ESF) de diferentes aislamientos varió en los rangos de 134,36%-523,48%, 127,39%-296,95% y 148,05-241,80 para CaHPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y AlPO_4 respectivamente. Encontrando una mayor ES de los aislamientos bacterianos en los medios suplementados con Ca-P seguido de Al-P y Fe-P. Esto puede deberse al grado de insolubilidad de las fuentes de fosfatos, ya que Bashan *et al.* (2013) menciona que los Ca-P son menos estables que Al-P y Fe-P, además menciona que el CaHPO_4 tiene mayor solubilidad que el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, por esta razón la ES en las dos fuentes de calcio es mayor en el medio GELP suplementado con CaHPO_4 en comparación con el medio de NBRIP suplementado con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Además, las cepas Sfcr-043-01, Sfcr-099-01, Sfcv-137-08 y Sfcr-059-02 fueron capaces de solubilizar CaHPO_4 con pH 7,0 y AlPO_4 con pH 4,6 en medio GELP sólido, lo que puede extender el intervalo de actividad de estas bacterias nativas en suelos con diferentes valores de pH.

Tabla 16

Eficiencia de la solubilización de fuentes de fosfatos insolubles definidos (AlPO_4 y FePO_4) por bacterias procedentes de la rizósfera de leguminosas de cobertura creciendo en suelos de la Subcuenca del Cumbaza-San Martín

Cepas	Leguminosa/Origen	AlPO_4	FePO_4
		12d	12d
CIAT 899	<i>Phaseolus vulgaris</i> /Palmira-Colombia.	CNS	CNS
Sfc-021-01	<i>Vigna unguiculata</i> /Chiri-C	CNS	CNS
Sfc-045-01	<i>Vigna unguiculata</i> /Cho-C	CNS	CNS
Sfc-077-05	<i>Vigna unguiculata</i> /Auca-A	CNS	CNS
Sfc-077-06	<i>Vigna unguiculata</i> /Auca-A	CNS	CNS
Sfc-093-02	<i>Vigna unguiculata</i> /Auca-A	CNS	CNS
Sfc-093-04	<i>Vigna unguiculata</i> /Auca-C	CNS	CNS
Sfc-102-01	<i>Vigna unguiculata</i> /Sha-A	CNS	CNS
Sfc-102-02	<i>Vigna unguiculata</i> /Sha-A	CNS	CNS
Sfc-159-01	<i>Vigna unguiculata</i> /Cho-A	CNS	CNS
Sfc-054-01-2	<i>Vigna unguiculata</i> /Vis-A	CNS	CNS
Sfc-054-02	<i>Vigna unguiculata</i> /Vis-A	CNS	CNS
Sfc-070-04	<i>Vigna unguiculata</i> /Vis-C	CNS	CNS
Sfc-133-01	<i>Vigna unguiculata</i> /San-B	CNS	CNS
Sfc-141-02	<i>Vigna unguiculata</i> /San-C	CNS	CNS
Sfcv-001-01	<i>Canavalia ensiformis</i> /Chiri-A	CNS	CNS
Sfcv-001-07	<i>Canavalia ensiformis</i> /Chiri-A	CNS	CNS
Sfcv-017-03	<i>Canavalia ensiformis</i> /Chiri-	CNS	CNS
Sfcv-041-01-2	<i>Canavalia ensiformis</i> /Chon-C	CNS	CNS
Sfcv-041-9	<i>Canavalia ensiformis</i> /Chon-C	CNS	CNS
sfcv-082-06	<i>Canavalia ensiformis</i> /Auca-B	CNS	CNS
Sfcv-082-11	<i>Canavalia ensiformis</i> /Auca-B	CNS	CNS
sfcv-089-01	<i>Canavalia ensiformis</i> /Auca-C	CNS	CNS
Sfcv-098-01	<i>Canavalia ensiformis</i> /Sha-A	CNS	CNS
Sfcv-098-02	<i>Canavalia ensiformis</i> /Sha-A	CNS	CNS
Sfcv-129-01	<i>Canavalia ensiformis</i> /San-B	CNS	CNS
Sfcv-137-08	<i>Canavalia ensiformis</i> /San-C	164,07 (\pm 4,15) c	CNS
Sfcv-201-01	<i>Canavalia ensiformis</i> /San-C	CNS	CNS
Sfp-048-04	<i>Cajanus cajan</i> /Cho-C	CNS	CNS
Sfp-063-10	<i>Cajanus cajan</i> /Vis-B	CNS	CNS
Sfp-071-02	<i>Cajanus cajan</i> /Vis-C	CNS	CNS

Cepa	Leguminosa/Origen	AlPO ₄	FePO ₄
		12d	12d
Sfp-160-01	<i>Cajanus cajan</i> /Cho-A	CNS	CNS
Sfcr-003-02	<i>Crotalaria juncea</i> /Chiri-A	CNS	CNS
Sfcr-028-01	<i>Crotalaria juncea</i> /Cho-A	CNS	CNS
Sfcr-043-01	<i>Crotalaria juncea</i> /Cho-C	241,80 (± 8,27) a	CNS
Sfcr-043-02	<i>Crotalaria juncea</i> /Cho-C	CNS	CNS
Sfcr-059-02	<i>Crotalaria juncea</i> /Vis-B	148,05 (± 1,66) c	CNS
Sfcr-091-06	<i>Crotalaria juncea</i> /Auca-C	CNS	CNS
Sfcr-099-01	<i>Crotalaria juncea</i> /Sha-A	204,46 (± 9,97) b	CNS
Sfcr-099-02	<i>Crotalaria juncea</i> /Sha-A	CNS	CNS
Sfcr-116-01	<i>Crotalaria juncea</i> /Sha-C	CNS	CNS
Sfcr-116-02	<i>Crotalaria juncea</i> /Sha-C	CNS	CNS
Sfcr-116-03	<i>Crotalaria juncea</i> /Sha-C	CNS	CNS
Sfcr-123-01	<i>Crotalaria juncea</i> /San-A	CNS	CNS
Sfcr-131-09	<i>Crotalaria juncea</i> /San-B	CNS	CNS
CV (%)		7,23	

Probado por la prueba de rango múltiple de Duncan con un rango crítico del 5%. Los medios representados por la misma letra no son significativamente diferentes. Los datos indicados anteriormente son valores promedio de tres repeticiones ± error estándar de la media. CNS = creció, pero no solubilizo.

3.4. Evaluación cuantitativa de la solubilización de fosfatos por BSF

Los cuarenta y cuatro aislados más el control positivo *Rhizobium tropici* CIAT 899 se incubaron en medio líquido NBRIP suplementado con Ca₃(PO₄)₂ y medio GELP suplementado con AlPO₄ y FePO₄, donde el fosfato soluble se midió en el medio líquido inoculado a los 5 días.

Muchas de las cepas que no mostraron un halo de solubilización en medio sólido fueron eficientes en la solubilización de fosfatos en medio líquido en especial para FePO₄.

Las cepas que solubilizaron FePO₄ (23), AlPO₄ (12) y Ca₃(PO₄)₂ (1) fueron significativamente diferentes al control no inoculado (P<0,01). Esto indica que los aislados ensayados han convertido el fosfato insoluble inorgánico en una forma soluble de manera efectiva. Los niveles de fosfato soluble en los controles no inoculados (blanco), en la evaluación de la solubilización en medio líquido, fueron 182,84 mg L⁻¹ para Ca₃(PO₄)₂, 154,63 mg L⁻¹ para AlPO₄ y 104,5 mg L⁻¹ para FePO₄ (anexo 6 y 7).

Entre las fuentes suplementadas con P, más cepas fueron capaces de solubilizar FePO_4 (23), que AlPO_4 (12) y ninguna cepa fue capaz de solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a excepción de control positivo (CIAT 899) ver Figura 23. A diferencia de autores como Chung *et al.*, (2005), Panda *et al.*, (2013) y Borah *et al.*, (2017) quienes encontraron distintos resultados en estudios que evaluaron la solubilización en tres fuentes de fosfatos (Ca, Al y Fe) en medio líquido Pikovskaya (PVK), donde más cepas fueron capaces de solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a comparación de AlPO_4 y FePO_4 . Por otra parte, Marra *et al.*, (2012) evaluó la solubilización por bacteria simbióticas y no simbióticas de los nódulos de *Vigna unguiculata* en tres fuentes de fosfatos (Ca, Al y Fe) en medio GELP suplementado con CaHPO_4 , FePO_4 y AlPO_4 encontrando la mayor cantidad de cepas eficientes en la solubilización de CaHPO_4 .

En cuanto a la solubilización de las tres fuentes de fosfatos a los 5 días de incubación, la solubilización máxima se dio en el medio suplementado con AlPO_4 con la cepa Sfcv-041-01-2 ($55,99 \text{ mg L}^{-1}$) seguido de FePO_4 con la cepa Sfc-077-05 ($43,29 \text{ mg L}^{-1}$) y ninguna cepa solubilizo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, a excepción del control positivo CIAT-899 ($38,03 \text{ mg L}^{-1}$) (Figs. 4, 5 y 6). Lo que difiere con los resultados obtenidos por Marra *et al.*, (2012); Cisneros, (2015); Sharon *et al.*, (2016); Panda *et al.*, (2016); y Pradhan *et al.*, (2017) que encontraron los mayores valores de solubilización de P insoluble en Ca-P, a comparación de Al-P y de Fe-P.

Los resultados obtenidos en este trabajo, donde la mayor cantidad de cepas solubilizaron FePO_4 más que las demás fuentes de fosfatos podría ser un atributo positivo, porque según Shrivastava *et al.*, (2018) el $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ es una de las formas predominantes de fosfato en suelos tropicales (suelos ácidos). Además, el mayor número de cepas capaces de solubilizar FePO_4 y AlPO_4 en comparación de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ puede estar relacionado con los mayores contenidos insolubles de fosfatos de Fe y Al presente en los suelos de la subcuenca alta y media de Cumbaza. Lo que corrobora con lo mencionado por Marra *et al.*, (2012) quienes discuten de acuerdo a sus resultados obtenidos que el mayor número de cepas capaces de solubilizar CaHPO_4 y $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ puede estar relacionado con los mayores contenidos insolubles de fosfato de Ca y Al del suelo de Patos de Minas, Brasil.

3.4.1. Solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ por bacterias rizosféricas de leguminosas

La figura 23 muestra la capacidad de solubilización de fosfato de todos los aislados de BSF en medio líquido NBRIP que contiene $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Donde según su capacidad de

solubilización, ningunos de los aislados fueron capaces de solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, a excepción de control positivo *Rhizobium tropici* CIAT 899 que tuvo una solubilización de 220,87 mg P L⁻¹ que estadísticamente es superior a todos los tratamientos en estudio.

El análisis de varianza muestra diferencias estadísticas altamente significativas en la solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ de los tratamientos, lo que significa que difieren en su capacidad solubilizadora en mg L⁻¹ ($p \leq 0,01$). Así mismo el coeficiente de variabilidad es de 3,72% y el coeficiente de determinación R² de 100% (ver tabla 17).

Tabla 17

Análisis de varianza para la eficiencia de solubilización de fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Fuente de variabilidad	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.C	P - Valor Sig.
Cepa	45	1141690,13	25370,89	2631,24	< 0,0001 **
Error	230	2217,7	10		
Total	275	1143907,83			

** : Altamente significativo a $P < 0,01$

C.V= 3,72%

R²= 100%

El 80% de las cepas aisladas fueron capaces de solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en medio sólido, mientras ninguna de las cepas aislada evaluadas fue capaz de solubilizar el fosfato en medio líquido, incluso consumieron el P que estaba disponible anteriormente en el control no inoculado por lo que ninguna no solubilizó el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a excepción del control positivo (CIA-899) que, según Marra *et al.*, 2011 es una cepa con capacidad solubilizadora de CaHPO_4 . Además, el hecho de haber obtenido solubilización de fosfatos por la cepa control CIAT 899, implica que las condiciones experimentales fueron adecuadas, descartándose la posibilidad de algún fallo experimental evitando su repetición.

Las 44 cepas que no presentaron actividad solubilizadora de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, puede haber estado influenciado por la presencia de carbonatos coexistentes en el medio del fosfato mineral. Debido a que si hay condiciones adecuadas para la saturación de un medio acuoso con

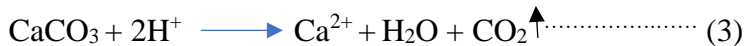
dióxido de carbono (CO_2), podría facilitar la disolución de los minerales de fosfato de calcio; según la ecuación (I).



Sin embargo, en presencia de carbonatos minerales, provenientes del metabolismo de la glucosa, estos reaccionan fácilmente con el agua formando un intermediario (ácido carbonico) y a su vez disociándose en ion bicarbonato y un proton ver ecuación 2:



La presencia de este ion bicarbonato puede afectar el mecanismo de solubilación de fosfato mediados por la producción de ácidos orgánicos debido a que el ion bicarbonato reacciona de manera espontánea con el calcio proveniente de la solubilización de fosfato temprana (ecuación I) formando carbonato de calcio. A su vez este carbonato de calcio reacciona con los protones derivados de la ecuación 2 liberando nuevamente el CO_2 en forma de gas (volatilización) ecuación 3, según Bashan *et al.*, 2013 esta ecuación evita la acidificación del medio y, en consecuencia, retarda la solubilización del fosfato mineral.



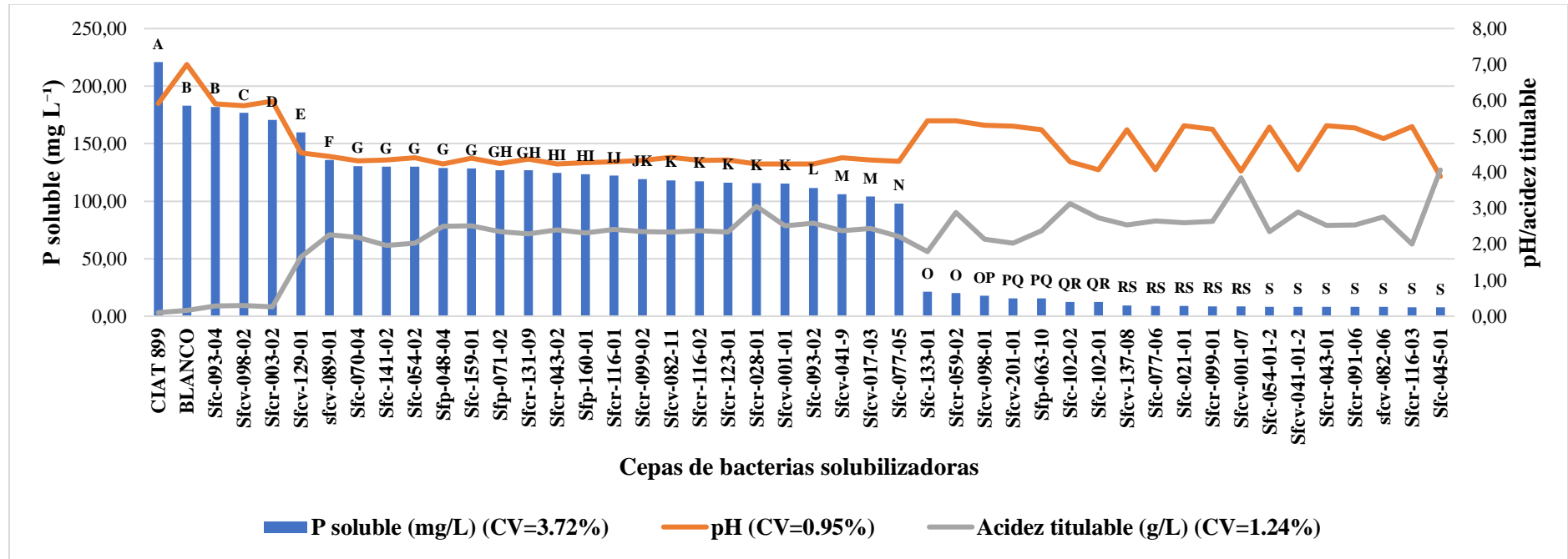


Figura 23. Concentración de P soluble por la acción de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de leguminosas en medio líquido con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente entre sí. Probado por la prueba de rango múltiple de Duncan con un rango crítico del 5%.

3.4.2. Solubilización de AlPO_4 por bacterias rizosféricas de leguminosas

El análisis de varianza muestra diferencias estadísticas altamente significativas en la solubilización de AlPO_4 de las cepas evaluadas, lo que significa que difieren en su capacidad solubilizadora en mg P L^{-1} ($p \leq 0,01$). Así mismo el coeficiente de variabilidad fue 3,67% y el coeficiente de determinación R^2 de 100% (tabla 18)

Tabla 18

Análisis de varianza para la solubilización de AlPO_4

Fuente de variabilidad	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.C	P - Valor Sig.
Cepa	45	891902,34	19820,05	1076,28	< 0,0001 **
Error	230	4235,52	18,42		
Total	275	896137,87			

** : Altamente significativo a $P < 0,01$

C.V= 3,67%

$R^2= 100\%$

En el análisis de comparación de medias de Duncan, para la solubilización de AlPO_4 en mg P L^{-1} se puede observar que el resultado de cada cepa tiene diferencia altamente significativa entre sí. Donde, la cepa Sfcv-041-01-2 ($55,99 \text{ mg L}^{-1}$) fue superior con respecto a las demás cepas. Seguido de las cepas Sfc-093-04 ($26,50 \text{ mg L}^{-1}$) y Sfcv-098-02 ($22,65 \text{ mg L}^{-1}$) que estadísticamente son iguales y presentaron los segundos mayores valores, mientras las cepas Sfc-141-02 ($2,57 \text{ mg L}^{-1}$) y Sfp-048-04 (0 mg L^{-1}) presentaron la menor solubilización en AlPO_4 . Trabajos anteriores muestran valores cercanos a los resultados obtenidos en este estudio, así como Panda *et al.*, (2016) y Pradhan *et al.*, (2017) que encontraron una solubilización máxima de $61,3$ y 40 mg P L^{-1} respectivamente. Mientras autores como Marra *et al.*, (2012); Sharon *et al.*, (2016) y Borah *et al.*, (2017), encontraron una solubilización máxima menores de 20 mg P L^{-1} . Todos estos resultados pueden deberse al lugar de aislamiento y estar relacionados con el pH del suelo, lo que

explica una alta solubilización reportados por Panda *et al.*, (2016), Pradhan *et al.*, (2017) y en nuestro estudio, ya que las BSF fueron aisladas de suelos ácidos con pH bajos.

En nuestro estudio cuatro cepas fueron capaces de solubilizar AlPO_4 en el medio sólido (GELP), a través de un halo de solubilización, estas mismas cepas no fueron capaces de solubilizar en medio líquido, esta correlación negativa puede estar relacionado con la producción de exopolisacáridos por las bacterias ya que estos compuestos producidos sobre medios sólidos permanecen concentrados localmente y en combinación con ácidos orgánicos pueden solubilizar fosfatos insolubles (Yi *et al.*, 2008). Por otra parte, en los medios líquidos de GELP, los exopolisacáridos pueden dispersarse, disminuyendo su actividad como mecanismo de solubilización (Marra *et al.*, 2011).

La figura 24 muestra que el pH del sobrenadante cultivado varió entre 5,23 el más alto y 3,03 el más bajo a final de la evaluación experimental, independientemente de las cepas utilizadas. Se observó una correlación positiva entre el P soluble y el pH del sobrenadante ($r=+0,81$) cultivado a los 5 días de incubación, resultados similares a lo que reportaron por Marra *et al.*, (2011 y 2012). Una muestra de este efecto son las cepas Sfcv-041-01-2 y Sfc-093-04 que obtuvieron la máxima solubilización, siendo además las que tuvieron los valores más altos de pH, superando al control no inoculado (blanco) (4,67). Con respecto a las cepas que mostraron una mínima solubilización en valores de pH bajos. Lo que indica que mecanismos diferentes a la reducción del pH pueden estar involucrados en este proceso.

También hubo una correlación negativa entre la acidez titulable y la solubilización de AlPO_4 cultivado ($r = -0,87$) a los 5 días de incubación. Donde muestra la Figura 24 que la cepa Sfcr-099-01 produce la mayor acidez titulable presentando la menor solubilización de AlPO_4 , mostrado que, a mayor producción de ácidos orgánicos, expresado como ácido tartárico, posiblemente no influye en solubilización de AlPO_4 . La acidez titulable varía desde 0,14 el más bajo a 3,34 g L⁻¹ el más alto.

La solubilización de AlPO_4 se produjo sin la alteración del pH, tal vez debido a que el pH inicial del cultivo ya era bajo (4,6), lo mismo se produjo en las evaluaciones de este fosfato realizado por Marra *et al.*, (2011 y 2012). También se encontraron resultados similares en un estudio sobre un medio de cultivo con un pH inicial de 7, donde se produjo la solubilización del AlPO_4 sin producir necesariamente ácidos orgánicos, aunque hubo una disminución en el pH final reportado por Panda *et al.*, (2016), quienes además obtuvieron

una cantidad de acidez titulable de (0,31 a 0,5 g L⁻¹), producido por las cepas que solubilizaron AlPO₄. Dichos resultados se relacionan con la cantidad de acidez titulable producido por las cepas aisladas en nuestro trabajo que solubilizaron esta fuente de fosfato (0,15 a 0,70 g L⁻¹).

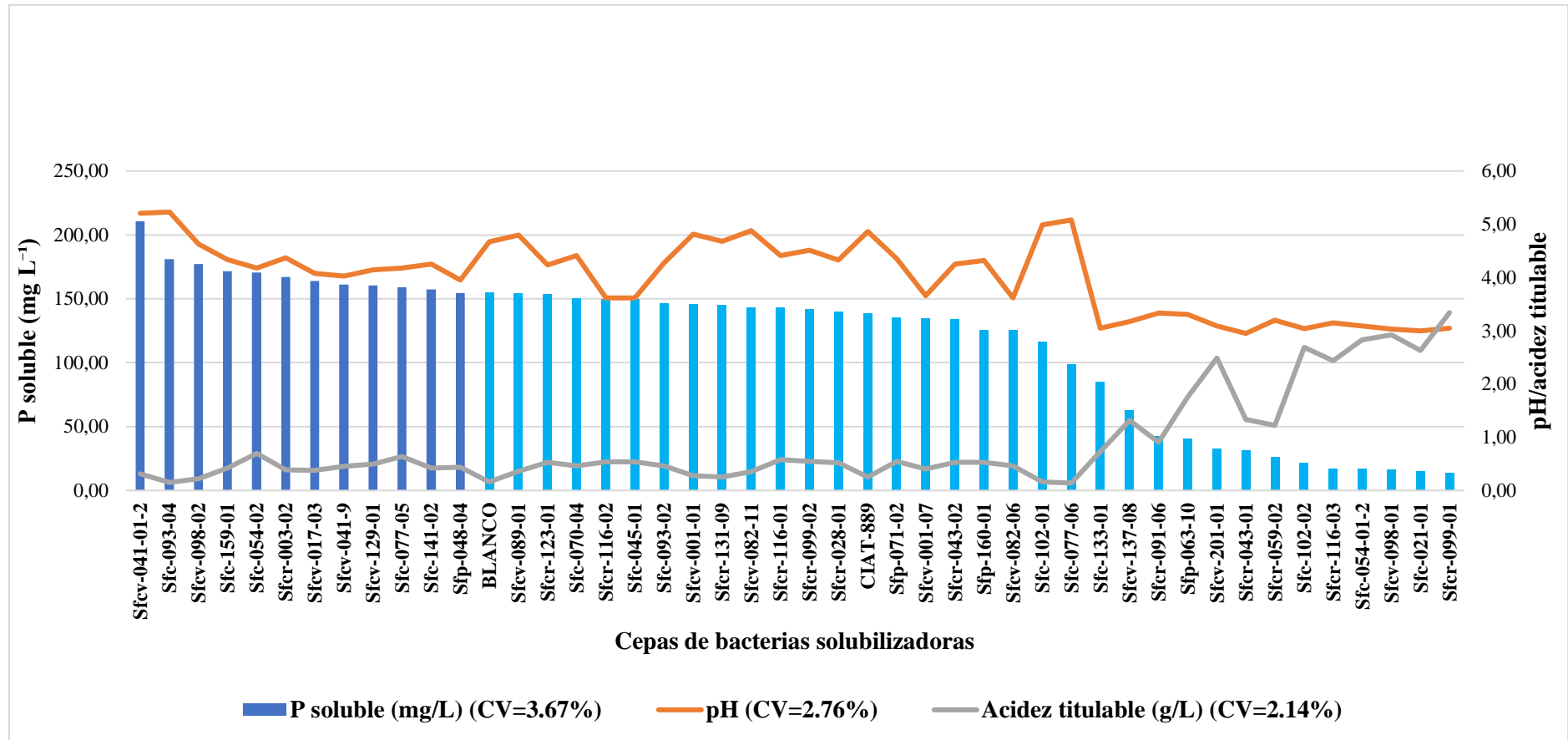


Figura 24. Concentración de P solubilizado por la acción de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de leguminosas en medio líquido con AlPO_4 (barras azules) y P consumido por cepas bacterianas aisladas (barras celestes).

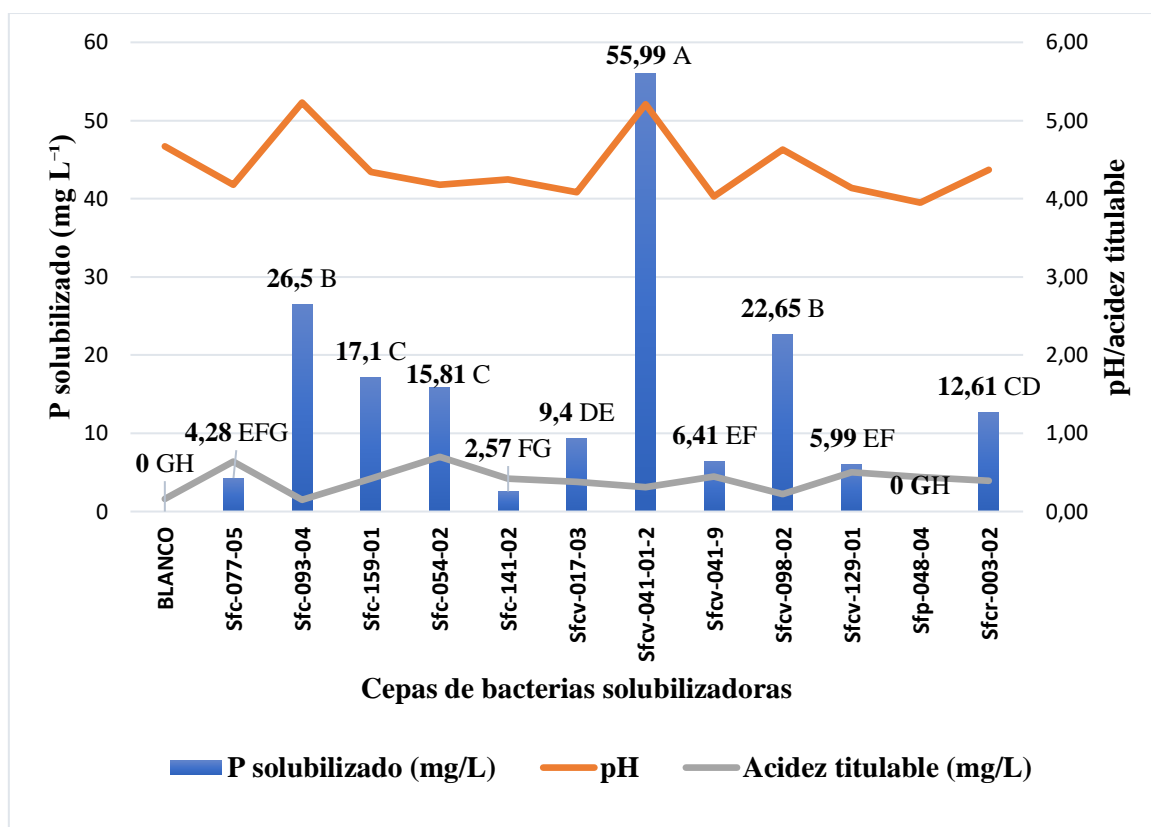


Figura 25. Prueba de Duncan ($P < 0,01$) para el efecto de la solubilización de AlPO_4 por bacterias rizosféricas de leguminosas. Los valores se determinaron tomando la diferencia entre la cantidad de P soluble que se encuentra en el medio de cultivo inoculado y la cantidad en el tratamiento de control sin inoculación. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.

3.4.3. Solubilización de FePO_4 por bacterias rizosféricas de leguminosas

El análisis de varianza muestra diferencias estadísticas altamente significativas en la solubilización de FePO_4 de las cepas evaluadas, lo que significa que difieren en su capacidad solubilizadora de fosfato en mg L^{-1} ($p \leq 0,01$). Así mismo el coeficiente de variabilidad fue 3,85% y el coeficiente de determinación R^2 de 100% (tabla 19)

Tabla 19

Análisis de varianza para la solubilización de FePO_4

Fuente de variabilidad	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.C	P - Valor Sig.
Cepa	45	724322,64	16096,06	1653,06	< 0,0001 **
Error	230	2239,54	9,74		
Total	275	726562,18			

** : Altamente significativo a $P < 0,01$

C.V= 3,85%

$R^2 = 100\%$

En el análisis de comparación de medias de Duncan, para la solubilización de FePO_4 , se pudo observar que las cepas presentan diferencias altamente significativas entre sí. Siendo la cepa Sfc-077-05 ($43,29 \text{ mg L}^{-1}$) superior estadísticamente con respecto a las demás cepas. Un segundo grupo estadístico estuvo formado por las cepas Sfc-159-01 ($37,31 \text{ mg L}^{-1}$), Sfcv-041-9 ($34,96 \text{ mg L}^{-1}$) y otras nueve cepas que presentaron valores similares. Un tercer grupo formado por las cepas Sfcr-099-02 ($5,37 \text{ mg L}^{-1}$) y Sfp-160-01 ($5,13 \text{ mg L}^{-1}$) presentaron los valores más bajos. Resultados similares fueron reportados por Borah *et al.*, (2017) quienes encontraron una solubilización máxima de 30 mg L^{-1} . Por el contrario, autores como Panda *et al.*, (2016) y Pradhan *et al.*, (2017) reportaron valores de solubilización de $175,5$ y $103,4 \text{ mg PO}_4 \text{ L}^{-1}$, respectivamente, los cuales son superiores a los obtenidos en este estudio. Actualmente es escasa las publicaciones sobre solubilización de fosfatos en suelos ácidos, por lo que es necesario tener en cuenta que las cepas con superior solubilización de FePO_4 aisladas en el presente estudio provienen de suelos extremadamente ácidos con pH de 3,99 a 4,62.

Ninguna cepa solubilizó FePO_4 en medio GELP sólido, pero si se observó solubilización de FePO_4 en medio GELP líquido (23 cepas). Este resultado fue observado por Pérez *et al.*, (2007), quien afirma que las cepas que no mostraron halo de solubilización en el medio sólido NBRIP presentaron una menor actividad de solubilización en el medio sólido sin la formación del halo característico alrededor de la colonia. Una explicación a este resultado fue dada por Bashan *et al.*, (2013) quien sugiere que el mecanismo de solubilización a través de la formación de complejos insolubles de Ca y Al o Fe (quelantes) podría solubilizar el fosfato, pero sin la presencia de halo de solubilización en placas de agar, por lo que podrían malinterpretarse como la ausencia de solubilización de fosfatos.

La figura 26 nos muestra la relación entre la solubilización de FePO_4 , el pH y la acidez titulable del sobrenadante de las cepas cultivadas. El pH varió entre 6,4 el más alto y 2,39 el más bajo a final de la evaluación experimental, independientemente de las cepas utilizadas, todas las cepas redujeron el pH del medio en comparación con el control no inoculado (blanco) de pH 7,0. Además, se encontró una correlación positiva entre el P soluble y el pH del sobrenadante ($r = +0,28$) de cepas cultivadas en medio GELP. Según Marra *et al.*, (2012) en la evaluación del FePO_4 en medio GELP líquido encontraron una correlación negativa entre el pH y el contenido de P disponible, indicando una tendencia hacia la solubilización solo para cepas que podrían disminuir el pH del medio de cultivo. Por otra parte, Panda *et al.*, (2016) observaron una disminución en el pH del medio, para

todos los aislamientos evaluados en comparación con el control no inoculado, mencionado que la disminución en el pH del medio de cultivo podría deberse a la secreción de ácidos orgánicos producidos por BSF. Estos resultados concuerdan con nuestro trabajo, sin embargo es necesario mencionar que las cepas solubilizadoras de FePO_4 que presentaron una mayor actividad solubilizadora, aunque redujeron el pH, presentaron valores de pH más altos que otras cepas, sin sobrepasar el pH del tratamiento blanco.

También muestra una correlación negativa entre el P soluble y la acidez titulable del sobrenadante ($r = -0,64$) cultivado a los 5 días de incubación. La figura 26 muestra que la cepa Sfcv-098-01 produce una mayor cantidad de acidez titulable presentando la menor solubilización de FePO_4 . Además, la producción de la acidez titulable en general fue variable ($0,09$ a $3,37 \text{ g L}^{-1}$), donde las 23 cepas que solubilizaron FePO_4 produjeron una acidez titulable baja entre $0,31$ y $1,30 \text{ g L}^{-1}$. Esto muestra que la presencia de ácidos orgánicos, expresado como ácido tartárico, probablemente no sea el mecanismo de solubilización de esta fuente de fosfato. Panda *et al.*, (2016) también encontraron una acidez titulable baja de $0,31$ a $0,64 \text{ g L}^{-1}$ en 12 cepas que solubilizaron el FePO_4 .

Marra *et al.*, (2012) cuantificaron seis ácidos orgánicos (cítrico, gluconico, láctico, succínico, oxálico, propionico) que son relevantes para la solubilización de fosfatos donde su producción varió de acuerdo con las condiciones de cultivo. Sin embargo, la presencia de ácidos orgánicos no necesariamente causó la solubilización de CaHPO_4 y $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, con evidencia de que los mecanismos de solubilización son diferentes a los basados en la producción de ácidos orgánicos. Otros mecanismos como la liberación de compuestos microbianos tales como exopolisacáridos o sideróforos pueden estar involucrados, y ser capaces de quelar iones metálicos y, por lo tanto, pueden influir en la disponibilidad P (Yi *et al.*, 2008; Shrivastava *et al.*, 2018).

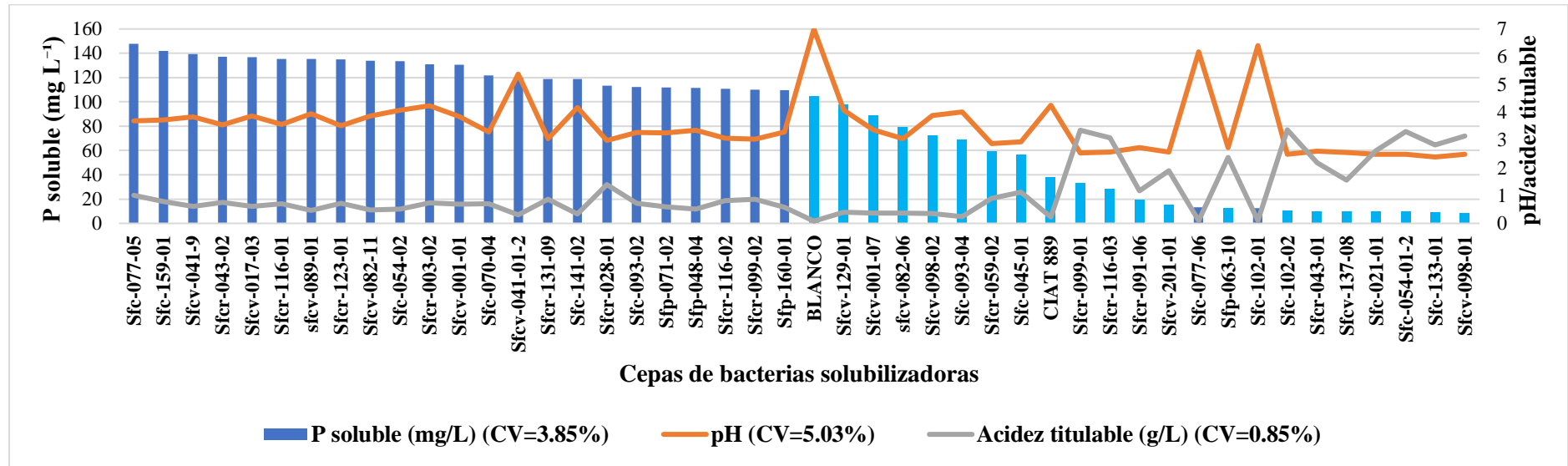


Figura 26. Concentración de P solubilizado (barras azules) y fosfato residual (barras celestes) como consecuencia de la acción solubilizadora de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de leguminosas en medio GELP líquido con FePO_4 .

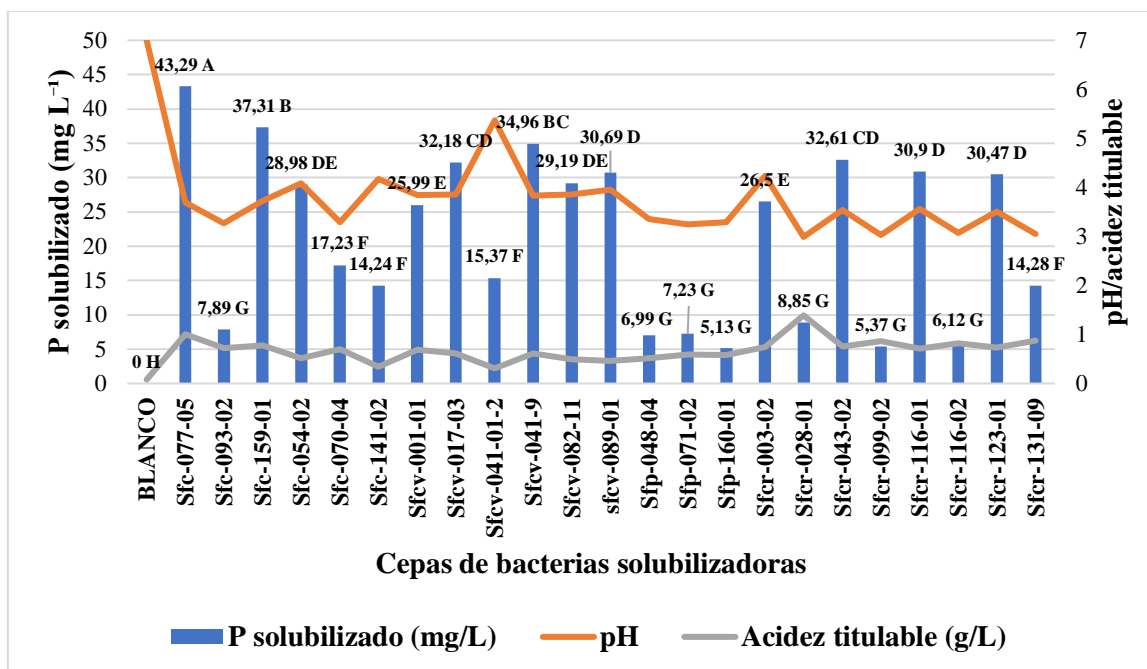


Figura 27. Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto de la solubilización de FePO_4 por bacterias rizosféricas de leguminosas. Los valores se determinaron tomando la diferencia entre la cantidad de P soluble que se encuentra en el medio de cultivo inoculado y la cantidad en el tratamiento de control sin inoculación. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente entre sí.

Los suelos ácidos son deficientes en nutrientes, especialmente de P (Shrivastava et al., 2018). Nuestros resultados muestran que existen BSF con un alto potencial de solubilización, esto es debido a que las leguminosas presentan la capacidad única de realizar dos tipos de simbiosis (micorrízica y rizobiana), además las BSF asociadas a estas plantas, podrían cubrir la demanda de este nutriente, debido a que el P es importante en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno y por ende es de vital importancia para su crecimiento y desarrollo (Nogueira *et al.*, 2012). Estas leguminosas en condiciones de suelos ácidos desarrollan diferentes mecanismos morfológicos y bioquímicos para mejorar la adquisición de P con el fin de mejorar su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) (Vardien *et al.*, 2016). Estos mecanismos incluyen adaptaciones radiculares especializadas (raíces proteoides), exudados de raíz, aumento de la excreción de fosfatasa en las raíces y nódulos para movilizar P (Magadlela *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

1. La instalación de sistemas de plantas de leguminosas para la captura de BSF, resulto una técnica muy eficiente. Logrando aislar 132 cepas, de las cuales solo 44 cepas fueron representantes de los grupos morfocoloniales en estudio. Todas estas cepas presentaron un halo de solubilización alrededor de la colonia en el medio GELP suplementado con fosfato ácido de calcio (CaHPO_4).
2. Las cepas bacterianas obtenidas de la rizósfera de leguminosas mostraron una gran variabilidad en morfologías coloniales, como diferentes colores, tamaños y formas. De acuerdo a la reacción Gram el 93% de las bacterias fueron Gram negativas presentaron una forma bacilar.
3. En la evaluación cualitativa el 80% de las cepas fueron capaces de solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ con rango de ESF de 127,92% a 505,75%, así mismo el 11% de cepas solubilizaron AlPO_4 en un rango de ESF de 148,05% a 241,8%. En la evaluación cuantitativa el 52% de las cepas solubilizaron FePO_4 alcanzando una máxima de solubilización de 55.99 mg L^{-1} por la cepa Sfcv-041-01-2 y el 27% de las cepas solubilizaron AlPO_4 con una máxima solubilización de $43,29 \text{ mg L}^{-1}$ por la cepa Sfc-077-05.
4. Los suelos degradados de la región San Martín albergan bacterias con buen potencial de solubilización de fosfatos inorgánicos para ser empleados como inoculantes en condiciones de suelos nativos ácidos para su recuperación.

RECOMENDACIONES

1. Es necesario estudios adicionales a las cepas de BSF, depositadas en el laboratorio de Microbiología Agrícola “Raúl Ríos Reátegui”. Para determinar otras cualidades PGPR además de la capacidad solubilizadora de fosfatos, por ejemplo, la producción de sustancias con acción hormonal, la producción de ACC deaminasa y sideróforos, y la producción de metabolitos con actividad biocida, entre otros.
2. Ampliar los estudios de BSF presentes en más especies de leguminosas nativas presentes en suelos ácidos para determinar el rango de hospedante.
3. Se deberá continuar con el estudio de las mejores cepas solubilizadoras de fosfatos, así como la formulación de inoculantes (análisis de diferentes sustratos y tiempo de supervivencia de los microorganismos), para su empleo en estudios de inoculación en invernadero y campo con leguminosas nativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, E., Galindo-Castaneda, T., Prada, F., Navia, M., y Romero, H. M. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology* 80: 26-33.
- Anderson, D. M., Glibert, P. M., y Burkholder, J. M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25: 704-726.
- Arfarita, N., Lestari, M. W., Murwani, I., & Higuchi, T. (2017). Isolation of Indigenous Bacteria of Phosphate Solubilizing from Green Bean Rhizospheres. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*, 4, 845-851.
- Bahena, M. H. R., Salazar, S., Velázquez, E., Laguerre, G., y Peix, A. (2015). Characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria associated with pea (*Pisum sativum* L.) isolated from two agricultural soils. *Symbiosis* 67: 33-41.
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., y de-Bashan, L. E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and fertility of soils* 49: 465-479.
- Behera, B. C., Singdevsachan, S. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., y Thatoi, H. N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove-a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3: 97-110.
- Borah, M., Das, P., Pathak, S. S., Boro, R. C., y Barooah, M. (2017). Phosphate Solubilization by Endophytic Bacteria isolated from *Oryza sativa*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(10), 2713-2721.
- Casanova, E. F. (1995). Agronomic evaluation of fertilizers with special reference to natural and modified phosphate rock. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 41: 211-218.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., y Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34: 33-41.
- Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., y Sa, T. (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the

- rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1970-1974.
- Cisneros, C. A., y Menjivar, J. C. (2017). Identification of phosphate solubilizing bacteria in a Andisol of Colombian coffee region. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 21-28.
- Cooper, J., Lombardi, R., Boardman, D., y Carliell-Marquet, C. (2011). The future distribution and production of global phosphate rock reserves. *Resources, Conservation and Recycling*, 57: 78-86.
- Cordell, D., y White, S. (2014). Life's bottleneck: sustaining the world's phosphorus for a food secure future. *Annual Review of Environment and Resources* 39: 161-188.
- Cordell, D., y White, S. (2015). Tracking phosphorus security: indicators of phosphorus vulnerability in the global food system. *Food Security*, 7(2), 337-350.
- Costa, E. M. D., Carvalho, F. D., Nóbrega, R. S. A., Silva, J. S., & Moreira, F. M. D. S. (2016). Bacterial strains from floodplain soils perform different plant-growth promoting processes and enhance cowpea growth. *Scientia Agricola*, 73(4), 301-310.
- Dawson, C. J., y Hilton, J. (2011). Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy*, 36: S14-S22.
- Dionisio, J. y Pimentel, I. (2016). *Amostragem e preparo do solo*. Capítulo II. En: Guia prático de biologia do solo. Curitiba-Brasil. SBCS/NEPAR.
- Dorozhkin, S. V. (2011). Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomatter*, 1: 121-164.
- Eida, A. A., Hirt, H., y Saad, M. M. (2017). Challenges faced in field application of phosphate-solubilizing bacteria. In *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation* (pp. 125-143). Springer, Singapore.
- Fernández, M. T., y Rodríguez, H. (2006). Aplicaciones biológicas de las fitasas: papel en los fertilizantes microbianos. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar.11: 27-34.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Griggs, D., Stafford-Smith, M., Gaffney, O., Rockström, J., Öhman, M. C., Shyamsundar, P., Steffen, W., Glaser, G., Kanie, K y Noble, I. (2013). Policy: Sustainable development goals for people and planet. *Nature*, 495: 305-307.

- Ingle, K. P., y Padole, D. A. (2017). Phosphate Solubilizing Microbes: An Overview. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6: 844-852.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática, INEI (2018), Accesado el 27/02/2018. Disponible en: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1185/.
- International Plant Nutrition Institute (IPNI), 2017. Fuentes de nutrientes específicos- Roca fosfórica. Disponible en: <http://www.ipni.net/specifics-es>.
- Iyer, B., Rajput, M. S., y Rajkumar, S. (2017). Effect of succinate on phosphate solubilization in nitrogen fixing bacteria harbouring chick pea and their effect on plant growth. *Microbiological research*, 202, 43-50.
- Karpagam, T., y Nagalakshmi, P. K. (2014). Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from agricultural soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3: 601-614.
- Khan, M. S., Zaidi, A., y Ahmad, E. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In *Phosphate Solubilizing Microorganisms* (pp. 31-62). Springer International Publishing.
- Khan, M. S., Zaidi, A., y Wani, P. A. (2009). Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. In *Sustainable agriculture* (pp. 551-570). Springer Netherlands.
- Lang, M., Christie, P., Zhang, J., y Li, X. (2018). Long-term phosphorus application to a maize monoculture influences the soil microbial community and its feedback effects on maize seedling biomass. *Applied Soil Ecology*, 128, 12-22
- Liu, Z., Li, Y. C., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J. S., y Zhang, M. (2015). Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology*, 96: 217-224.
- Magadlela, A., Beukes, C., Venter, F., Steenkamp, E., y Valentine, A. (2017). Does P deficiency affect nodule bacterial composition and N source utilization in a legume from nutrient-poor Mediterranean-type ecosystems?. *Soil Biology and Biochemistry*, 104, 164-174.
- Manzoor, M., Abbasi, M. K., & Sultan, T. (2017). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their potential for rock phosphate solubilization–mineralization and plant growth promotion. *Geomicrobiology journal*, 34(1), 81-95.

- Marra, L. M., Oliveira, S. M. D., Soares, C. R. F. S., y Moreira, F. M. D. S. (2011). Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Scientia Agricola*, 68: 603-609.
- Marra, L. M., Soares, C. R. F. S., de Oliveira, S. M., Ferreira, P. A. A., Soares, B. L., de Fráguas Carvalho, R., ... y de Souza Moreira, F. M. (2012). Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, 357, 289-307.
- Murphy, J. A. M. E. S., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170: 265-270.
- Nogueira, N. O., Oliveira, O. D., Martins, C. D. S., y Bernardes, C. D. O. (2012). Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. *Enciclopédia Biosfera*, 8, 2012-2031.
- Noumavo, P. A., Agbodjato, N. A., Baba-Moussa, F., Adjanooun, A., y Baba-Moussa, L. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology* 15: 1452-1463.
- Oufdou, K., Bechtaoui, N., El Alaoui, A., Benidire, L., Daoui, K., y Göttfert, M. 2016. Symbiotic rhizobacteria for improving of the agronomic effectiveness of phosphate fertilizers. *Procedia Engineering*, 138: 325-331.
- Panda, B., Rahman, H., Chatlod, L. R., y Panda, J. (2013). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the soils of Sikkim, India. *International journal of Bio-resource and Stress Management*, 4, 255-262.
- Panda, B., Rahman, H., y Panda, J. (2016). Phosphate solubilizing bacteria from the acidic soils of Eastern Himalayan region and their antagonistic effect on fungal pathogens. *Rhizosphere*, 2: 62-71.
- Patiño-Torres, C. O., y Sanclemente-Reyes, O. E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10: 288-297.
- Pérez, E., Sulbaran, M., Ball, M. M., & Yarzabal, L. A. (2007). Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11), 2905-2914.

- Pingale, S. S., y Virkar, P. S. (2017). Influence of Phosphate Dissolving Micro-Organisms on Yield and Phosphate Uptake by Crops. *International Journal of Chemical and Life Sciences*, 2: 1143-1145.
- Pradhan, M., Sahoo, R. K., Pradhan, C., Tuteja, N., & Mohanty, S. (2017). Contribution of native phosphorous-solubilizing bacteria of acid soils on phosphorous acquisition in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Protoplasma*, 254(6), 2225-2236.
- Prieto-Correal, G. C., Prada-Salcedo, L. D., Cuervo, C., y Franco-Correa, M. (2015). Evaluation of organic acid production by *Streptomyces* spp. and solubilization of three phosphorus sources by strain T3A. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17: 111-121.
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., y Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista Cenic Ciencias Biológicas* 46: 63-76.
- Rfaki, A., Nassiri, L., y Ibijbijen, J. (2014). Phosphate-Solubilizing Bacteria in the Rhizosphere of Some Cultivated Legumes from Meknes Region, Morocco. *British Biotechnology Journal*, 4(9), 946.
- Rodríguez-Navarro, D. N., Buendia, A. M., Camacho, M., Lucas, M. M., y Santamaria, C. (2000). Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South-West Spain. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 1601-1613.
- Sattari, S. Z., Bouwman, A. F., Rodríguez, R. M., Beusen, A. H. W., y Van Ittersum, M. K. (2016). Negative global phosphorus budgets challenge sustainable intensification of grasslands. *Nature communications*, 7, 10696.
- Scholz, R. W., Ulrich, A. E., Eilittä, M., & Roy, A. (2013). Sustainable use of phosphorus: a finite resource. *Science of the Total Environment*, 461: 799-803.
- Selvi, K. B., Paul, J. J. A., Vijaya, V., y Saraswathi, K. (2017). Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. *Biochem Mol Biol J*, 3(1).
- Sharon, J. A., Hathwaik, L. T., Glenn, G. M., Imam, S. H., & Lee, C. C. (2016). Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *Journal of soil science and plant nutrition*, 16(2), 525-536.
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W y Zhang, F. (2011). Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant physiology* 156: 997-1005.

- Shrivastava, M., Srivastava, P. C., y D'Souza, S. F. (2018). Phosphate-Solubilizing Microbes: Diversity and Phosphates Solubilization Mechanism. In *Role of Rhizospheric Microbes in Soil* (pp. 137-165). Springer, Singapore.
- Sylvester-Bradley, R., Asakawa, N., Torraca, S. L., Magalhães, F. M. M., Oliveira, L. A., y Pereira, R. M. (1982). Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizósfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica*, Manaus 12: 15-22.
- Toro, M., Ramírez-Bahena, M. H., Cuesta, M. J., Velázquez, E., y Peix, A. (2013). *Pseudomonas guariconensis* sp. nov., isolated from rhizospheric soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63: 4413-4420.
- U.S. Geological Survey, (2018). Mineral commodity summaries. Phosphate Rock Statistics and Information. Disponible en: http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/phosphate_rock/ (Revisado el: 17.12.2014).
- Vaccari, D. A. (2009). Phosphorus: a looming crisis. *Scientific American*, 300: 54-59.
- Vardien, W., Steenkamp, E. T., y Valentine, A. J. (2016). Legume nodules from nutrient-poor soils exhibit high plasticity of cellular phosphorus recycling and conservation during variable phosphorus supply. *Journal of plant physiology*, 191, 73-81.
- Yi, Y., Huang, W., y Ge, Y. (2008). Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of microbiology and biotechnology*, 24, 1059-1065.
- Zapata, F., y Roy, R. N. (Eds.). (2007). Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. FAO.

ANEXOS

Anexo 1: Medios de cultivos para la evaluación de la solubilización de fosfatos insolubles

Glucosa-extracto de levadura (GELP) (1 litro)

• Glucosa	10 g
• Extracto de levadura	0,5 g
• MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,0 ml
• Solución CaCl ₂ (1%)	2,0 ml
• Solución NaCl (10%)	1,0 ml
• Solución de micronutrientes	2,0 ml
• Fe-EDTA	10 ml
• KNO ₃	0,1 g
• Agar	15 g
• Agua destilada	1000 ml
• PH	7,0

Para **CaHPO₄** adicionar:

50 ml de solución K₂HPO₄ (10%)

100 ml de solución CaCl₂ (10%)

TSB (tripton soy beft) (1 litro)

• Tryptona	15 g
• Peptona	5 g
• NaCl	5 g
• H ₂ O destilada	1000 ml
• pH	7,0

TSA (tryptone soy agar) (1 litro)

• Tryptona	15 g
• Peptona	5 g
• NaCl	5 g
• Agar	15 g
• H ₂ O destilada	1000 ml
• pH	6,9

Medio NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate) (1litro)

• Glucosa	10 g
• Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
• (NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g
• MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,25g
• KCl	0,2 g
• MgCl ₂ . 6H ₂ O	5 g
• Agar	15 g
• PH	7

Medio Sylvester con FePO₄ (1litro)

• FePO ₄	0,89 g
• Glucosa	10 g
• Extracto de levadura	0,5 g
• MgSO ₄ . 7H ₂ O	2.0 ml
• Solución CaCl ₂	2,0 ml
• Solución NaCl	1,0 ml
• Solución de micronutrientes	2,0 ml
• Fe-EDTA	10 ml
• KNO ₃	0,1 g
• Agua destilada	1000 ml
• PH	7,0

Medio Sylvester con AlPO₄ (1litro)

• AlPO ₄	0,89 g
• Glucosa	10,0 g
• Extracto de levadura	0,5 g
• MgSO ₄ . 7H ₂ O	2,0 ml
• Solución CaCl ₂	2,0 ml
• Solución NaCl	1,0 ml
• Solución de micronutrientes	2,0 ml
• Fe-EDTA	10 ml
• KNO ₃	0,1 g
• Agua destilada	1000 ml
• PH	4,5

Anexo 2: Soluciones y reactivos

Solución salina fisiológica (1 litro)

- NaCl 8,5 g
- H₂O 1000 ml

Reactivos para medir fosfato soluble

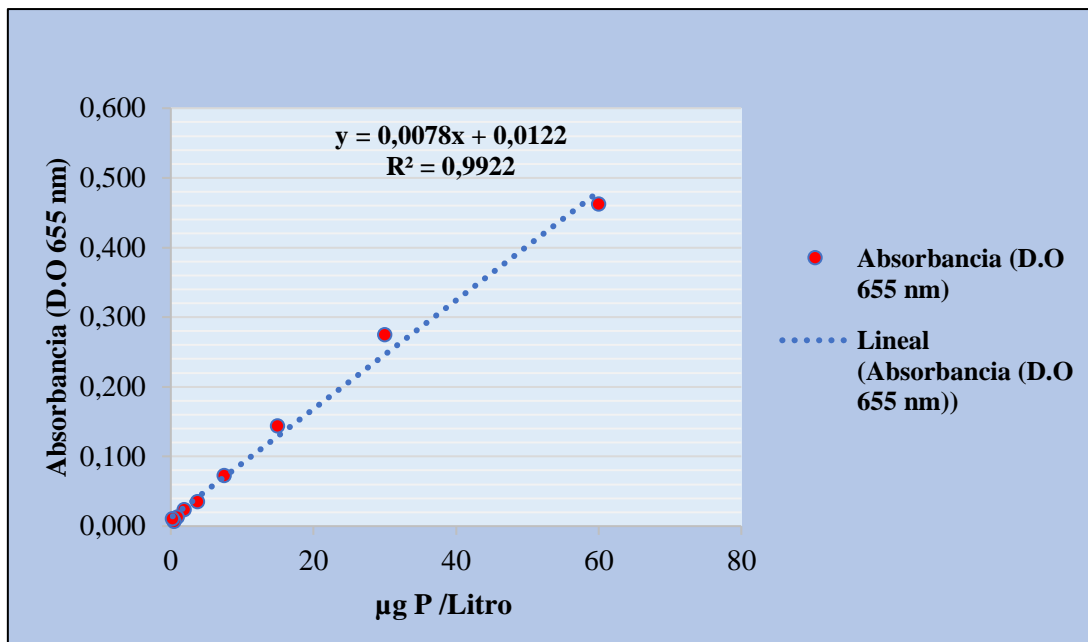
- Solución A: (1,5 g de heptamolibdato de amonio en 50 ml de agua destilada)
- Solución B: (14 ml de ácido sulfúrico concentrado en 90 ml de agua destilada)
- Solución C: (2,7 g de ácido ascórbico en 50 ml de agua destilada)
- Solución C: (0,034 g de tartrato de antimonio y potasio en 25 ml de agua destilada)

Anexo 3: Mezcla reactiva para medir fosfato soluble

- 10 ml solución A
- 25 ml solución B
- 10 ml solución C
- 5 ml solución D

Anexo 4: Curva patrón para determinar amonio

μmol P L	Absorbancia (D.O 655 nm)				PROMEDIO (Absorbancia)
	I	II	III	IV	
60	0,437	0,475	0,452	0,486	0,463
30	0,28	0,258	0,276	0,285	0,275
15	0,124	0,14	0,151	0,162	0,144
7,5	0,053	0,073	0,077	0,087	0,073
3,75	0,036	0,014	0,038	0,054	0,036
1,88	0,018	0,023	0,019	0,034	0,024
0,94	0,012	0,018	0,008	0,015	0,013
0,47		0,006	0,003	0,012	0,007
0,25			0,004	0,017	0,011

Anexo 5: Figura de la curva patrón de fosfato soluble (PO₄)

Anexo 6: Evaluación cuantitativa de la solubilización de $AlPO_4$

Cepas	Leguminosa/ Origen	$AlPO_4$		
		pH	Acidez titulable (g/L)	Cuantificación del fosfato soluble en medio líquido (mg/L)
Blanco	-	4,67 (\pm 0,01) ^{EFG}	0,16 (\pm 0,01) ^X	154,63 (\pm 1,73) ^{GH}
CIAT 899	<i>Phaseolus vulgaris</i> / Palmira-Colombia	4,86 (\pm 0,02) ^{CDE}	0,25 (\pm 0,01) ^{UWX}	138,61 (\pm 2,58) ^{KLM}
Sfc-021-01	Caupí/Chiri-C	3 (\pm 0,00) ^{RS}	2,63 (\pm 0,05) ^{DE}	15,19 (\pm 0,62) ^X
Sfc-045-01	Caupí/Cho-C	3,62 (\pm 0,01) ^P	0,54 (\pm 0,02) ^{LMN}	149,5 (\pm 0,84) ^{HI}
Sfc-077-05	Caupí/Auca-A	4,18 (\pm 0,04) ^{KLMN}	0,64 (\pm 0,06) ^{JKL}	158,91 (\pm 0,90) ^{EFG}
Sfc-077-06	Caupí/Auca-A	5,08 (\pm 0,02) ^{AB}	0,14 (\pm 0,01) ^X	98,71 (\pm 3,60) ^P
Sfc-093-02	Caupí/Auca-A	4,27 (\pm 0,04) ^{JKLM}	0,46 (\pm 0,01) ^{MNOPQR}	146,51 (\pm 1,13) ^{IJ}
Sfc-093-04	Caupí/Auca-C	5,23 (\pm 0,14) ^A	0,15 (\pm 0,00) ^X	181,13 (\pm 1,58) ^B
Sfc-102-01	Caupí/Sha-A	4,99 (\pm 0,04) ^{BC}	0,16 (\pm 0,01) ^X	116,26 (\pm 1,86) ^O
Sfc-102-02	Caupí/Sha-A	3,04 (\pm 0,00) ^{RS}	2,69 (\pm 0,01) ^{CD}	21,58 (\pm 1,02) ^{UV}
Sfc-159-01	Caupí/Cho-A	4,34 (\pm 0,02) ^{IJKL}	0,42 (\pm 0,03) ^{NOPQRS}	171,73 (\pm 2,37) ^C
Sfc-054-01-2	Caupí/Vis-A	3,09 (\pm 0,01) ^{RS}	2,83 (\pm 0,02) ^{BC}	16,77 (\pm 0,57) ^{WX}
Sfc-054-02	Caupí/Vis-A	4,18 (\pm 0,08) ^{KLMN}	0,7 (\pm 0,25) ^{JK}	170,44 (\pm 0,77) ^C
Sfc-070-04	Caupí/Vis-C	4,41 (\pm 0,02) ^{IJ}	0,46 (\pm 0,01) ^{MNOPQR}	150,15 (\pm 0,79) ^{HI}
Sfc-133-01	Caupí/San-B	3,05 (\pm 0,02) ^{RS}	0,73 (\pm 0,01) ^J	84,74 (\pm 2,32) ^Q
Sfc-141-02	Caupí/San-C	4,25 (\pm 0,00) ^{JKLM}	0,42 (\pm 0,01) ^{NOPQRS}	157,2 (\pm 0,96) ^{FG}
Sfcv-001-01	Canavalia/Chiri-A	4,81 (\pm 0,02) ^{CDEF}	0,28 (\pm 0,01) ^{TUV}	146,09 (\pm 1,38) ^{IJ}
Sfcv-001-07	Canavalia/Chiri-A	3,66 (\pm 0,02) ^P	0,4 (\pm 0,03) ^{OPQRS}	134,76 (\pm 2,33) ^{LM}

Cepas	Leguminosa/ Origen	AlPO ₄		
		pH	Acidez titulable (g/L)	Cuantificación del fosfato soluble en medio líquido (mg/L)
Sfcv-017-03	Canavalia/Chiri-C	4,08 (± 0,07) ^{MNO}	0,38 (± 0,03) ^{QRST}	164,03 (± 1,76) ^{DE}
Sfcv-041-01-2	Canavalia/Chon-C	5,21 (± 0,00) ^A	0,31 (± 0,01) ^{STUW}	210,62 (± 6,27) ^A
Sfcv-041-9	Canavalia/Chon-C	4,03 (± 0,06) ^{NO}	0,45 (± 0,04) ^{MNOPQR}	161,04 (± 0,61) ^{EF}
sfcv-082-06	Canavalia/Auca-B	3,62 (± 0,02) ^P	0,46 (± 0,03) ^{MNOPQR}	125,68 (± 0,80) ^N
Sfcv-082-11	Canavalia/Auca-B	4,88 (± 0,05) ^{CD}	0,35 (± 0,00) ^{RSTU}	143,31 (± 0,94) ^{JK}
Sfcv-089-01	Canavalia/Auca-C	4,8 (± 0,03) ^{CDEF}	0,36 (± 0,01) ^{RSTU}	154,42 (± 1,35) ^{GH}
Sfcv-098-01	Canavalia/Sha-A	3,03 (± 0,00) ^{RS}	2,92 (± 0,03) ^B	16,17 (± 0,65) ^X
Sfcv-098-02	Canavalia/Sha-A	4,63 (± 0,03) ^{FGH}	0,22 (± 0,01) ^{WX}	177,28 (± 0,55) ^B
Sfcv-129-01	Canavalia/San-B	4,14 (± 0,03) ^{LMNO}	0,5 (± 0,02) ^{MNOPQ}	160,62 (± 1,47) ^{EF}
Sfcv-137-08	Canavalia/San-C	3,17 (± 0,01) ^{QR}	1,32 (± 0,02) ^H	62,52 (± 2,28) ^R
Sfcv-201-01	Canavalia/San-C	3,09 (± 0,01) ^{RS}	2,49 (± 0,05) ^{EF}	32,52 (± 1,89) ^T
Sfp-048-04	Puspino/Cho-C	3,95 (± 0,03) ^O	0,44 (± 0,02) ^{NOPQR}	154,63 (± 1,80) ^{GH}
Sfp-063-10	Puspino/Vis-B	3,31 (± 0,00) ^Q	1,75 (± 0,01) ^G	40,64 (± 0,99) ^S
Sfp-071-02	Puspino/Vis-C	4,35 (± 0,02) ^{IJKL}	0,55 (± 0,05) ^{LMN}	135,62 (± 1,48) ^{LM}
Sfp-160-01	Puspino/Cho-A	4,32 (± 0,01) ^{IJKL}	0,53 (± 0,02) ^{LMNO}	125,81 (± 1,41) ^N
Sfcr-003-02	Crotalaria/Chiri-A	4,37 (± 0,11) ^{IJK}	0,39 (± 0,03) ^{PQRST}	167,24 (± 0,92) ^{CD}
Sfcr-028-01	Crotalaria/Cho-A	4,33 (± 0,01) ^{IJKL}	0,52 (± 0,01) ^{LMNOP}	139,89 (± 1,35) ^{KL}
Sfcr-043-01	Crotalaria/Cho-C	2,95 (± 0,33) ^S	1,33 (± 0,01) ^H	31,41 (± 1,69) ^T
Sfcr-043-02	Crotalaria/Cho-C	4,25 (± 0,08) ^{JKLM}	0,53 (± 0,04) ^{LMNO}	133,69 (± 1,03) ^M
Sfcr-059-02	Crotalaria/Vis-B	3,2 (± 0,02) ^{QR}	1,22 (± 0,02) ^H	25,94 (± 1,29) ^U

Cepas	Leguminosa/ Origen	AlPO ₄		
		pH	Acidez titulable (g/L)	Cuantificación del fosfato soluble en medio líquido (mg/L)
Sfcr-091-06	Crotalaria/Auca-C	3,33 (± 0,04) ^Q	0,91 (± 0,03) ^I	42,47 (± 3,45) ^S
Sfcr-099-01	Crotalaria/Sha-A	3,05 (± 0,00) ^{RS}	3,34 (± 0,03) ^A	13,63 (± 1,04) ^X
Sfcr-099-02	Crotalaria/Sha-A	4,51 (± 0,07) ^{GHI}	0,55 (± 0,04) ^{LMN}	142,03 (± 1,05) ^{JK}
Sfcr-116-01	Crotalaria/Sha-C	4,41 (± 0,03) ^{IJ}	0,58 (± 0,04) ^{KLM}	143,31 (± 1,28) ^{JK}
Sfcr-116-02	Crotalaria/Sha-C	4,46 (± 0,07) ^{HIJ}	0,53 (± 0,03) ^{LMNO}	149,93 (± 0,84) ^{HI}
Sfcr-116-03	Crotalaria/Sha-C	3,15 (± 0,00) ^{QRS}	2,44 (± 0,01) ^F	16,81 (± 0,73) ^{WX}
Sfcr-123-01	Crotalaria/San-A	4,34 (± 0,02) ^{IJKL}	0,53 (± 0,01) ^{LMNO}	153,78 (± 0,51) ^{JH}
Sfcr-131-09	Crotalaria/San-B	4,68 (± 0,01) ^{DEFG}	0,25 (± 0,01) ^{TUW}	145,44 (± 0,63) ^{IJ}
CV(%)		6,68	7,42	11,67

Validado mediante la prueba de rango múltiple de Duncan con un 95% de probabilidad. Las medias representadas por la misma letra no son significativamente diferentes. Los datos indicados anteriormente son valores promedio de tres repeticiones ± error estándar de la media.

Anexo 7: Evaluación cuantitativa de la solubilización de FePO₄

Cepas	Leguminosa/ Origen	FePO ₄		
		pH	Acidez titulable (g/L)	Cuantificación del fosfato soluble en medio líquido (mg/L)
Blanco	-	7,00 (± 0,00) ^A	0,08 (± 0,00) ^Z	104,5 (± 0,35) ^H
CIAT 899	<i>Phaseolus vulgaris</i> / Palmira-Colombia	4,26 (± 0,01) ^D	0,22 (± 0,01) ^Y	37,84 (± 0,63) ^N
Sfc-021-01	Caupí/Chiri-C	2,48 (± 0,00) ^T	2,62 (± 0,01) ^D	10,02 (± 0,57) ^{QR}
Sfc-045-01	Caupí/Cho-C	2,93 (± 0,00) ^{PQR}	1,13 (± 0,01) ^J	56,77 (± 1,12) ^M
Sfc-077-05	Caupí/Auca-A	3,69 (± 0,01) ^{GHIJK}	1,01 (± 0,01) ^K	147,79 (± 2,14) ^A
Sfc-077-06	Caupí/Auca-A	6,17 (± 0,06) ^B	0,1 (± 0,01) ^Z	13,29 (± 0,41) ^{PQ}
Sfc-093-02	Caupí/Auca-A	3,27 (± 0,04) ^{LMNO}	0,72 (± 0,01) ^{PQ}	112,39 (± 1,65) ^G
Sfc-093-04	Caupí/Auca-C	4,02 (± 0,01) ^{DEFG}	0,25 (± 0,01) ^Y	69,23 (± 0,89) ^L
Sfc-102-01	Caupí/Sha-A	6,4 (± 0,02) ^B	0,09 (± 0,00) ^Z	12,43 (± 1,96) ^{PQR}
Sfc-102-02	Caupí/Sha-A	2,49 (± 0,00) ^T	3,37 (± 0,02) ^A	10,57 (± 0,84) ^{QR}
Sfc-159-01	Caupí/Cho-A	3,73 (± 0,01) ^{GHIJ}	0,78 (± 0,01) ^{NO}	141,81 (± 0,9) ^B
Sfc-054-01-2	Caupí/Vis-A	2,48 (± 0,00) ^T	3,31 (± 0,02) ^A	9,7 (± 0,73) ^{QR}
Sfc-054-02	Caupí/Vis-A	4,08 (± 0,05) ^{DEF}	0,52 (± 0,01) ^S	133,48 (± 1,8) ^{DE}
Sfc-070-04	Caupí/Vis-C	3,29 (± 0,04) ^{LMNO}	0,7 (± 0,01) ^{PQ}	121,73 (± 1,18) ^F
Sfc-133-01	Caupí/San-B	2,39 (± 0,00) ^T	2,83 (± 0,01) ^C	9,44 (± 0,83) ^{QR}
Sfc-141-02	Caupí/San-C	4,17 (± 0,02) ^{DE}	0,34 (± 0,01) ^{WX}	118,74 (± 0,94) ^F
Sfcv-001-01	Canavalia/Chiri-A	3,85 (± 0,01) ^{EFGHI}	0,69 (± 0,02) ^Q	130,49 (± 0,33) ^E
Sfcv-001-07	Canavalia/Chiri-A	3,37 (± 0,04) ^{KLM}	0,37 (± 0,01) ^{UW}	88,8 (± 0,91) ^J

Cepas	Leguminosa/ Origen	FePO ₄		
		pH	Acidez titulable (g/L)	Cuantificación del fosfato soluble en medio líquido (mg/L)
Sfcv-017-03	Canavalia/Chiri-C	3,86 (± 0,00) ^{EFGHI}	0,61 (± 0,01) ^R	136,68 (± 1,07) ^{CD}
Sfcv-041-01-2	Canavalia/Chon-C	5,37 (± 0,02) ^C	0,31 (± 0,01) ^X	119,87 (± 1,86) ^F
Sfcv-041-9	Canavalia/Chon-C	3,83 (± 0,01) ^{FGHIJ}	0,61 (± 0,01) ^R	139,46 (± 1,32) ^{BC}
sfcv-082-06	Canavalia/Auca-B	3,05 (± 0,06) ^{MNOPR}	0,37 (± 0,03) ^{UW}	79,4 (± 0,98) ^K
Sfcv-082-11	Canavalia/Auca-B	3,86 (± 0,03) ^{EFGHI}	0,49 (± 0,01) ST	133,69 (± 1,47) ^{DE}
sfcv-089-01	Canavalia/Auca-C	3,95 (± 0,04) ^{DEFG}	0,46 (± 0,02) ^T	135,19 (± 2,08) ^D
Sfcv-098-01	Canavalia/Sha-A	2,49 (± 0,01) ^T	3,15 (± 0,01) ^B	8,8 (± 0,93) ^R
Sfcv-098-02	Canavalia/Sha-A	3,89 (± 0,02) ^{EFGH}	0,35 (± 0,00) ^{WX}	72,39 (± 0,9) ^L
Sfcv-129-01	Canavalia/San-B	4,08 (± 0,01) ^{DEF}	0,41 (± 0,02) ^U	98,16 (± 1,41) ^I
Sfcv-137-08	Canavalia/San-C	2,56 (± 0,00) ST	1,56 (± 0,01) ^H	10,06 (± 0,58) ^{QR}
Sfcv-201-01	Canavalia/San-C	2,57 (± 0,00) ST	1,89 (± 0,01) ^G	15,57 (± 0,79) ^P
Sfp-048-04	Puspino/Cho-C	3,35 (± 0,03) ^{LMN}	0,52 (± 0,01) ^S	111,49 (± 1,14) ^G
Sfp-063-10	Puspino/Vis-B	2,73 (± 0,01) ^{RST}	2,38 (± 0,01) ^E	12,54 (± 1,5) ^{PQR}
Sfp-071-02	Puspino/Vis-C	3,25 (± 0,03) ^{KLMNO}	0,59 (± 0,01) ^R	111,73 (± 0,86) ^G
Sfp-160-01	Puspino/Cho-A	3,29 (± 0,04) ^{KLMN}	0,58 (± 0,02) ^R	109,63 (± 1,02) ^G
Sfcr-003-02	Crotalaria/Chiri-A	4,24 (± 0,67) ^D	0,74 (± 0,01) ^{OPQ}	131 (± 1,52) ^E
Sfcr-028-01	Crotalaria/Cho-A	2,99 (± 0,02) ^{OPQR}	1,39 (± 0,02) ^I	113,35 (± 0,64) ^G
Sfcr-043-01	Crotalaria/Cho-C	2,6 (± 0,01) ST	2,19 (± 0,08) ^F	10,15 (± 0,53) ^{QR}
Sfcr-043-02	Crotalaria/Cho-C	3,54 (± 0,01) ^{IJKL}	0,75 (± 0,03) ^{OP}	137,11 (± 0,51) ^{CD}
Sfcr-059-02	Crotalaria/Vis-B	2,88 (± 0,09) ^{QRS}	0,9 (± 0,08) ^L	59,46 (± 4,1) ^M

Cepas	Leguminosa/ Origen	FePO ₄		
		pH	Acidez titulable (g/L)	Cuantificación del fosfato soluble en medio líquido (mg/L)
Sfcr-091-06	Crotalaria/Auca-C	2,73 (± 0,04) ^{RST}	1,18 (± 0,01) ^J	19,68 (± 0,77) ^O
Sfcr-099-01	Crotalaria/Sha-A	2,54 (± 0,01) ^T	3,36 (± 0,01) ^A	33,2 (± 0,67) ^{PQR}
Sfcr-099-02	Crotalaria/Sha-A	3,03 (± 0,01) ^{NOPQR}	0,86 (± 0,01) ^{LM}	109,87 (± 1,29) ^G
Sfcr-116-01	Crotalaria/Sha-C	3,56 (± 0,00) ^{HIJKL}	0,71 (± 0,01) ^{PQ}	135,4 (± 0,39) ^D
Sfcr-116-02	Crotalaria/Sha-C	3,07 (± 0,03) ^{MNOPQ}	0,82 (± 0,02) ^{MN}	110,62 (± 1,22) ^G
Sfcr-116-03	Crotalaria/Sha-C	2,57 (± 0,00) ST	3,08 (± 0,04) ^B	28,71 (± 0,61) ^{QR}
Sfcr-123-01	Crotalaria/San-A	3,51 (± 0,01) ^{JKL}	0,73 (± 0,01) ^{OPQ}	134,97 (± 1,09) ^D
Sfcr-131-09	Crotalaria/San-B	3,05 (± 0,01) ^{MNOPQR}	0,87 (± 0,01) ^{LM}	118,78 (± 1,21) ^F
CV(%)		4,56	6,36	5,86

Validado mediante la prueba de rango múltiple de Duncan con un 95% de probabilidad. Las medias representadas por la misma letra no son significativamente diferentes. Los datos indicados anteriormente son valores promedio de tres repeticiones ± error estándar de la media.

