UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Mejoramiento de la fertilización fosfatada en la asociación ryegrass y trébol rojo mediante el uso de bacterias solubilizadoras de fosfato

Marilyn Tatiana Santos Torres

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia
2020

Mejoramiento de la fertilización fosfatada en la asociación ryegrass y trébol rojo mediante el uso de bacterias solubilizadoras de fosfato

Marilyn Tatiana Santos Torres

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Microbiología

Director:

Ph.D. German Andres Estrada Bonilla

Codirector:

Ph.D. Daniel Uribe Vélez

Línea de Investigación:

Microbiología Agrícola

Grupo de Investigación:

Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología

Bogotá, Colombia

2020

A Dios quien ha sido mi sostén y fortaleza en este camino de oportunidades nuevas, iluminándome a cada instante para la consecución de este logro.

A mi Hamilton y mis pequeñas Nicole & Lauren que han sido mi apoyo, motor y motivación para alcanzar los sueños propuestos.

A mis hermanos Deissy, Leonardo y Tibisay Santos que han sido mi bendición en la vida.

Mis padres quienes me formaron y me han permitido ser quien soy ahora y para ellos son mis triunfos.

A todas las personas que me aportaron y fueron apoyo incondicional y de quienes aprendí mucho más que conocimientos.

A Agrosavia entidad que me abrió sus puertas y me permitió retornar a la investigación.

"Trata de ser el que nunca se da por vencido, el que siempre da un paso adelante, el que confía en trabajo y no en la suerte, el que soporta el peso de sus obligaciones y las lleva a cabo con la sencilla elegancia de los vencedores"

Agradecimientos

Al Dr. Edwin Castro, director del proyecto, y al departamento de Nariño, el cual, mediante el sistema de regalías (SGR) fue la fuente de financiamiento de este trabajo de investigación y parte del apoyo económico para mis estudios.

A la Dra. Ruth Rebeca Bonilla y el Dr. Germán Estrada, por darme su confianza y apoyo en la ejecución de este proyecto que ha sido para mí un camino de aprendizaje y de nuevas expectativas para mi vida.

Al profe Dr. Daniel Uribe Vélez, por aceptar la codirección del proyecto y compartir conmigo su experiencia, conocimientos y aportes valiosos en esta temática de investigación. A Socorrito (Q.E.P.D) por sus concejos, ayuda y disposición siempre sincera y acertada durante mis estudios en la Universidad Nacional.

A Sandra Ramírez, Yulieth Gutiérrez, Jonathan Mendoza, Felipe Romero, Leidy Molano, Mauricio Barón y Yajaira Romero Barrera, por su amistad, acompañamiento y apoyo durante el desarrollo del trabajo. Y a todos los compañeros del grupo de Investigación de Sistemas agropecuarios Sostenibles de Agrosavia, por su apoyo, recomendaciones y aportes en la ejecución de la investigación.

A toda mi familia residente en Bogotá, en especial mí querida prima Derly Nayibe Mesa Santos, quienes me han acogido amorosamente en esta ciudad y su apoyo ha sido incondicional.

Resumen

En Colombia, los sistemas de producción de lechería especializada de trópico alto se soportan en pasturas, que se encuentran ubicados en zonas de mayor altura a los 2200 msnm y generan el 70% de la producción láctea nacional. El ryegrass *(Lolium* sp.*)* asociada con trébol rojo *(Trifolium pratense)* es una estrategia usada para proveer un alimento balanceado al ganado. Sin embargo, se ha visto limitada la producción de forrajes debido a las condiciones edáficas de los suelos (con mayor acidez y poca fertilidad), haciendo poco eficiente los fertilizantes fosfóricos. El uso de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) ha sido una alternativa para aumentar el crecimiento y rendimiento en las plantas, como la posibilidad de reducir sustancialmente el requerimiento de fertilizantes químicos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto potencial de BSF en la disminución de la dosis de fertilización mineral fosfatada en la asociación ryegrass-trébol rojo. Para ello, se seleccionaron a *Rhizobium* sp. T88 y *Herbaspirillum* sp. AP21, de entre diez BSF, por presentar un aumento significativo de biomasa seca frente al control en ryegrass (20,31%) y en trébol rojo, (44,8%) respectivamente. Ambas cepas resultaron tener habilidad de solubilizar roca fosfórica y fosfato tricálcico, producir ácido glucónico y expresar actividad fosfatasa. Solo *Herbaspirillum* sp. AP21, produjo sideroforos y presentó 125% de eficiencia de mineralización de fitato en medio sólido. Posteriormente, las cepas seleccionadas, fueron evaluadas junto a dosis reducidas del fertilizante soluble, fosfato diamónico (siglas en inglés, DAP) (75% y 50%) en inoculaciones simples y combinadas en asociación de ryegass-trébol rojo bajo condiciones de invernadero. La inoculación de *Rhizobium* sp. T88 con 75% DAP, incrementó el fósforo (P) disponible en las formas inorgánicas moderamente lábil (368,4 mg P kg^{-1}) y tuvo mayor contenido de P foliar (2,0 g kg^{-1}), comparado con aquellas plantas que no fueron inoculadas. Por el contrario, *Herbaspirillum* sp. AP21 proporcionó mayor mineralización del P orgánico, al incrementar el P disponible de las formas orgánicas moderadamente lábil del suelo, (coinoculada, 50% DAP: 264,6 mg P kg^{-1}) en comparación con los demás tratamientos y expresó mayor actividad fosfatasa alcalina en dosis reducida al 50% de DAP. Por lo tanto, el uso de estas cepas podría ser un complemento prometedor para la fertilización fosfórica en suelos con deficiencia de P, permitiendo reducir potencialmente las tasas de aplicación de fertilizantes fosfóricos en las praderas.

Palabras clave: Roca fosfórica, fertilización, *Rhizobium, Herbaspirillum*, DAP, PGPB.

Abstract

In Colombia, specialized tropical highland dairy production systems are supported by pastures, which they are located in higher altitudes to 2200 meters above sea level and generate 70% of the national dairy production. The ryegrass *(Lolium* sp.*)* associated with red clover *(Trifolium pratense)* is a strategy used to provide a balanced feed to cattle. However, forage production has been limited due to soil conditions (with greater acidity and low fertility), making phosphoric fertilizers inefficient. The use of phosphate solubilizing bacteria (PSB) has been an alternative to increase plant growth and yield, as the possibility of substantially reduce the requirement of chemical fertilizers. The objective of this study was to evaluate the potential effect of PSB in reducing the dose of phosphate mineral fertilization in the ryegrass-red clover association of the Department of Nariño. For this, *Rhizobium* sp. T88 and *Herbaspirillum* sp. AP21, out of ten PSB, for presenting a significant increase in dry biomass versus no inoculated control in ryegrass (20.31%) and red clover (44.8%) respectively. Both strains were found to have the ability to solubilize phosphoric rock and tricalcium phosphate, to produce gluconic acid and express phosphatase activity in NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate) liquid medium. Only *Herbaspirillum* sp. AP21, produced siderophores and presented 125% efficiency of phytate mineralization in solid medium. Subsequently, the selected strains were evaluated together with reduced doses of soluble fertilizer, diammonium phosphate (DAP) (75% and 50%) in simple and combined inoculations in association of red ryegass-trebol under greenhouse conditions. The inoculation of *Rhizobium* sp. T88 with 75% DAP, increased the available P in moderately labile inorganic forms (368,4 mg P kg^{-1}) and higher content of foliar P (2,0 g kg^{-1}), compared to those plants that were not inoculated. On the contrary, *Herbaspirillum* sp. AP21 provided greater mineralization of organic P, by increasing the available P of moderately labile organic forms of the soil, (coinoculated, 50% DAP: 264,6 mg P kg^{-1}) compared to the other treatments and expressed greater phosphatase activity alkaline in a dose reduced to 50% DAP. Therefore, the use of these strains could be a promising complement to phosphorus fertilization in P-deficient soils, potentially reducing application rates of phosphoric fertilizers in grasslands.

Keywords: Phosphate rock, fertilization, *Rhizobium, Herbaspirillum*, DAP, PGPB.

Tabla de contenido

Pág.

Tabla de contenido ..... **VII**

1. Lista de tablas ..... **IX**

2. Lista de figuras ..... **X**

3. Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XI**

4. Introducción **1**

1. Marco teórico **3**

1.1 Generalidades del fósforo en el suelo 3

1.2 Bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) 6

1.2.1 Mecanismos de solubilización de fosforo por bacterias solubilizadoras de fósforo 9

1.2.2 Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato en las plantas.13

1.3 Generalidades en producción de forrajes. 14

1.4 Asociación de pastos 15

4.4.1. Poaceaes 15

- Ryegrass (*Lolium* spp.) 16

1.4.2 Leguminosas 17

- Trébol rojo (*Trifolium pratense L*.) 18

Referencias bibliográficas 18

2. Problema de investigación y objetivos **29**

2.1 Problema de investigación 29

2.1.1 Planteamiento del problema 29

2.1.2 Justificación 30

2.1.3 Hipótesis 31

2.2 Objetivos 32

2.2.1 Obetivo general 32

2.2.2 Objetivos específicos 32

3. Caracterización de la capacidad de solubilización y mineralización de P de las cepas en estudio. **33**

Resumen 33

3.1 Introducción. 34

3.2 Materiales y métodos 35

3.2.1 Preparación de los inoculos usados en los experimentos 35

3.2.2 Selección de cepas mediante ensayo con plantas de ryegrass y trébol rojo en condiciones deficientes de P en el suelo. 37

3.2.3 Capacidad de solubilización de roca fosfórica, fosfato tricálcico y actividad fosfatasa en medio líquido de las cepas seleccionadas. 39

3.2.4 Cuantificación de ácidos orgánicos. 40
3.2.5 Determinación cualitativa de sideróforos y mineralización del ácido fítico. 41
3.2.6 Análisis estadístico....42
3.3 Resultados....42
3.3.1 Selección de las cepas en condiciones deficientes de P. 42
3.3.2 Capacidad de solubilización de roca fosfórica, fosfato tricálcico y actividad fosfatasa en medio líquido de las cepas seleccionadas. 45
3.3.3 Identificación y producción de ácidos orgánicos....49
3.3.4 Producción de sideróforos y mineralización de ácido fítico....47
3.4 Discusión....49
3.4.1 Selección de cepas mediante ensayo con plantas de ryegrass y trébol rojo en condiciones deficientes de P....49
3.4.2 Capacidad de solubilización de roca fosfórica, fosfato tricálcico, actividad fosfatasa y producción de ácidos orgánicos en medio líquido. 52
3.4.3 Producción de sideróforos y mineralización del fitato. 56
3.5 Conclusiones....57
Referencias bibliográficas....57

4. Influencia de la inoculación de BSF en la reducción de dosis de fertilizantes fosfóricos solubles en la asociación ryegrass-trébol rojo....68
Resumen....68
4.1 Introducción....69
4.2 Materiales y métodos....70
4.2.1 Ensayo de invernadero 70
4.2.2 Fraccionamiento de P y actividad fosfatasa ácida y alcalina en el suelo....72
4.2.3 Análisis estadístico....74
4.3 Resultados....74
4.3.1 Producción de biomasa y contenido nutricional de las plantas asociadas ryegrass y trébol rojo....74
4.3.2 Fraccionamiento de P y actividad fostasa ácida y alcalina en el suelo. 79
4.4 Discusión....85
4.4.1 Efecto de las inoculaciones en las diferentes dosis de los fertilizantes minerales en el P y actividad fosfatasa en el suelo y su incidencia en biomasa seca y contenido nutricional en las plantas de ryegrass - trébol rojo. 85
4.5 Conclusiones....90
Referencias bibliográficas....91

5. Conclusiones y recomendaciones 97
5.1 Conclusiones....97
5.2 Recomendaciones....98

Lista de tablas

Tabla 1-2. Producción de ácidos orgánicos por bacterias solubilizadoras de fosfato 11

Tabla 1-3. Valor nutricional promedio de muestras de pasto ryegrass de la sabana de Bogotá 17

Tabla 3--1. Características de las cepas utilizadas en el estudio 36

Tabla 3-2. Caracterización fisico química del suelo de sistemas silvopastoriles de Nariño 38

Tabla 3-3. Producción de fosfatasas, fitasas y sideróforos por las cepas de estudio 48

Tabla 3-4. Identificación y cuantificación de ácidos orgánicos en cultivos líquidos 49

Tabla 3-5. Correlaciones de Pearson entre producción de P soluble, actividad fosfatasa ácida y alcalina, pH y población en las dos fuentes de fosforo 54

Tabla 4-1. Influencia de la inoculación en las diferentes dosis de DAP en la producción de biomasa seca y contenido nutricional de las plantas en el primer corte* 75

Tabla 4-2. Influencia de la inoculación en las diferentes dosis de DAP en la producción de biomasa seca y contenido nutricional de las plantas en el segundo corte*..... 75

Tabla 4-3. Matriz de correlaciones de las variables del ACP del segundo corte 79

Tabla 4-4. Fraccionamiento de fósforo en suelos fertilizados con diferentes dosis de fosfato diamónico (DAP) y roca fosfórica (RF) con inoculaciones simples y combinadas de bacterias solubilizadoras de P (BSF)..... 81

Lista de figuras

Figura 1-1. Ciclo del fósforo en el medio ambiente. 3

Figura 1-2. Transformaciones fisicoquímicos y biológicas del P en los sistemas suelo-microorganismos-planta y solución del suelo. 5

Figura 1-3. Mecanismos de solubilización de Pi y mineralización de Po por microorganismos. 10

Figura 3-1. Metodología para la evaluación de solubilización de P *in vitro* 40

Figura 3-2. Efecto de las inoculaciones en la biomasa seca foliar de ryegrass perenne *(Lolium perenne* var. *One50)* y trébol rojo *(Trifolium pratense)* en suelos deficientes de P 44

Figura 3-3. Capacidad de solubilización de fosfatos de las cepas *Herbaspirillum* sp. AP21 y *Rhizobium* sp. T88 durante 12 días en medio líquido NBRIP. 47

Figura 3-4. Mineralización de fitato y producción de sideróforos por *Herbaspirillum* sp.. 48

Figura 4-1. Representación esquemática del protocolo de fraccionamiento secuencial de fósforo propuesto por Hedley (1982) adaptado de Bejarano et al., 2016 72

Figura 4-2. Análisis de componentes principales (ACP) entre biomasa seca y contenido nutricional (N, P, K, Ca y Mg) en la asociación ryegrass y trébol rojo en primer corte y segundo corte..... 78

Figura 4-3. Análisis de componentes principales de biomasa seca foliar, contenido de P foliar y los distintos compartimientos de P y actividad fosfatasa en el suelo, en los diferentes niveles de DAP e inoculación de cada tratamiento..... 83

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
B	Boro
Ca	Calcio
Cu	Cobre
Ha	Hectárea
K	Potasio
Kg	Kilogramo
Mg	Magnesio
N	Nitrógeno
Na	Sodio
P	Fósforo
S	Azufre
T	Tonelada
Zn	Zinc

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
µg	Microgramos
µmol	Micromol

Subíndices

Subíndice	Término
Pi_{RES}	Fracción P inorgánico extraído con resina de intercambio aniónica
Pi_{BIC}	Fracción P inorgánico extraído con Bicarbonato de sodio
Po_{BIC}	Fracción P orgánico extraído con Bicarbonato de sodio
$Pi_{NaOH-0,1}$	Fracción P inorgánico extraído con Hidróxido de sodio a 0,1N
$Po_{NaOH-0,1}$	Fracción P orgánico extraído con Hidróxido de sodio a 0,1N
P_{HCl}	Fracción P inorgánico extraído con Ácido clorhídrico a 1 M

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AO	Acidos orgánicos
BSF	Bacteria solubilizadora de fosfato
BFN	Bacterias fijadoras de nitrógeno
CNE	Carbohidratos no estructurales
DAP	Fosfato diamónico
DDI	Días después de inoculación
DDP	Después del plantío
DE	Desviación estándar
DM	Dry matter (materia seca)
DO	Densidad óptica
EM	Eficiencia de mineralización
EPS	Exopolisacárido
FDA	Fibra en detergente ácido
FDN	Fibra en detergente neutro
FTC	Fosfato tricálcico
HPLC	High performance liquid chromatography
K	Potasio
N	Nitrógeno
MO	Materia orgánica
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
MS	Materia seca
P	Fósforo
PC	Proteína cruda
Pi	Fósforo inorgánico
pNP o PNP	Paranitrofenol
Po	Fósforo orgánico
PIB	Producto interno bruto
PGPBs	Plant growth promoting bacterias
pH	Potencial de hidrogeniones
RIA-C	Resina de intercambio aniónico-catiónico
RF	Roca fosfórica
ss	Suelo seco
UFC	Unidades formadoras de colonia

Introducción

El sector ganadero en Colombia constituye un sector importante en la actividad económica del país, pues contribuye actualmente con el 3,6% del PIB nacional (FEDEGAN, 2019). Según datos de la Encuesta Nacional Agropecuaria - DANE (ENA, 2017), en Colombia hay 40,8 millones de hectáreas usadas para ganadería, representando el 78,2% de la participación total del uso del suelo para el sector agropecuario. De las cuales, la producción de forrajes domina con 60,1%, ocupando 24,5 millones de hectáreas. Estos datos indican la extensa área destinada a la alimentación del ganado para la obtención de carne, leche y de doble propósito.

Pese a ésta superficie que ocupan las pasturas en el país, la ganadería ha sido poco competitiva ya que su productividad depende de la disponibilidad y calidad del alimento. La variabilidad en la disponibilidad y la calidad del forraje afecta notablemente la producción de carne y/o leche. Lo anterior es debido principalmente a que en las áreas dedicadas a la producción ganadera en los últimos años se ha dado un proceso de degradación del suelo, lo que se traduce en baja fertilidad y a largo plazo en la disminución de la productividad del suelo (CORPONARIÑO, 2009).

Es por ello, que se ha considerado importante el manejo adecuado de las praderas como base fundamental para programas de alimentación ganadera en el trópico, pues proveen al animal de nutrientes esenciales para su desarrollo (Restrepo, 2008). La siembra de pasturas con asociaciones (leguminosas y gramíneas), es una estrategia ampliamente usada como una forma de proveer un alimento balanceado al ganado, por el aporte de proteínas y carbohidratos que brinda la asociación (Percy, 2012).

La estrategia para suplir las necesidades nutricionales de los animales de pastoreo debe ser planificada por los productores teniendo en cuenta cada una de las variables presentes, por lo tanto, el establecimiento de las relaciones suelo-microorganismos-planta-animal dentro de los sistemas de la ganadería lechera, es de vital importancia para implementar nuevos enfoques, con el fin de mejorar de forma integral, el sistema ganadero en el país (Eraso, 2014).

Los microorganismos desempeñan un papel importante en los sistemas agrícolas, en especial las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB, en inglés “Plant Growth Promoting Bacteria”). Las PGPB poseen varios mecanismos que ayudan a la absorción de nutrientes por las plantas, al proporcionar nitrógeno (N) fijado de la atmosfera y disponibilizar otros elementos como el fosforo (P) (Liu et al., 2014a; Pérez et al., 2007; Shahid et al., 2012), potasio (K) (Leaungvutiviroj et al., 2010; Usha y Padmavathi 2013; Restrepo-Correa et al., 2017) y zinc (Zn) (Whiting et al., 2001; Li et al., 2010). Además de producir sustancias fitoestimuladoras que promueven el crecimiento en las plantas (Meena et al., 2017).

Dentro del grupo de PGPB, se encuentran las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) presentes en el suelo, las cuales contribuyen en la movilización del fosforo, ya que mineralizan el P presente en la materia orgánica y solubilizan el P adsorbido por minerales del suelo, convirtiendo los compuestos insolubles del P, en fosfatos disponibles para las plantas. El uso potencial de estas BSF, constituyen un instrumento estratégico para mejorar la nutrición y el manejo de las pasturas dentro de un marco de desarrollo sostenible de los sistemas ganaderos (Pérez et ál., 2011).

1. Marco teórico

1.1 Generalidades del fósforo en el suelo

El P en el suelo está presente en diferentes formas (orgánicas e inorgánicas) que varían mucho en su biodisponibilidad. Estas incluyen constituyentes de minerales de roca del material de origen, completamente inaccesibles, diversas formas de materia orgánica (incluidos los constituyentes del humus y las células de organismos vivos) (Khan et al., 2014) y el fosfato biodisponible en solución (Dollard y Billard, 2003) (Fig. 1-1).

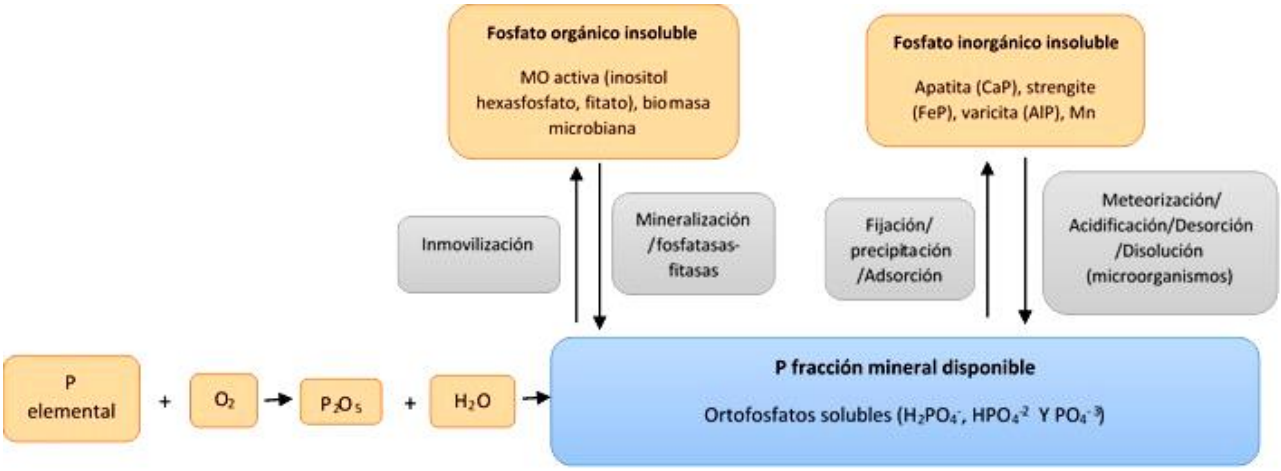


Figura 1-1. Ciclo del fósforo en el medio ambiente. Adaptación de Phrabu et al., 2019

El ciclo del P en el suelo, es un proceso dinámico, que involucra la transformación del P por procesos geoquímicos y biológicos (Arcand y Schneider, 2006) y su comportamiento en el ambiente se da en función de su especiación, que está directamente relacionada con la solubilidad, reactividad y biodisponibilidad de P (Liu et al., 2014b). Muchas de estas reacciones abióticas y bióticas que se desencadenan durante el ciclaje del P, ocurren en unos pocos segundos, mientras que otras ocurren lentamente durante varios años (Bünemann y Condron, 2007, Frossard et al., 2011).

Las formas de P disponibles para las plantas se encuentran en la solución del suelo como aniones de ortofosfato predominando las formas de $H_2PO_4^-$ y HPO_2^- (Frossard, et al., 1995). Las formas de iones ortofosfato presentes en el suelo, dependen del pH. El P que se encuentra en las rocas minerales de apatita, hidroxiapatitas y las oxiapatitas se caracteriza por su insolubilidad y porque está unido a calcio y magnesio, lo que le confiere baja solubilidad

(Behera et al., 2014). En el suelo, el P también puede formar complejos insolubles con óxidos de Fe (Fe-P) que son sensibles a las condiciones reductoras (Beauchemin et al., 2003). El P adsorbido por los óxidos de Al (Al-P) o los precipitados de fosfato de calcio, probablemente sean más sensible a los cambios de pH (Yan et al., 2014). Las transformaciones de estos minerales a través de procesos de fijación y precipitación, dependen altamente del pH y el tipo de suelo. Algunas especies de fósforo orgánico (Po) tienden a ser poco biodisponibles (Li y Brett, 2013).

Todas estas series de reacciones abióticas y bióticas dependientes del pH del suelo, influyen en la proporción de P soluble en el suelo (DeLuca et al., 2009). De estas reacciones son importantes la desorción y solubilización de fósforo inorgánico (Pi) rápidamente intercambiable; la captación de P por parte de los microorganismos y plantas del suelo (ya sea a través de sus raíces o mediante hifas de micorrizas); la liberación de Pi de la fase sólida del suelo o de los fertilizantes, inducida por la exudación de fosfatasas y ácidos orgánicos de las raíces o microorganismos; la liberación de Pi de los residuos de plantas o fertilizantes orgánicos a la solución del suelo; y la liberación de Pi de la mineralización de materia orgánica por microorganismos (Frossard et al., 2011) (Fig. 1-2).

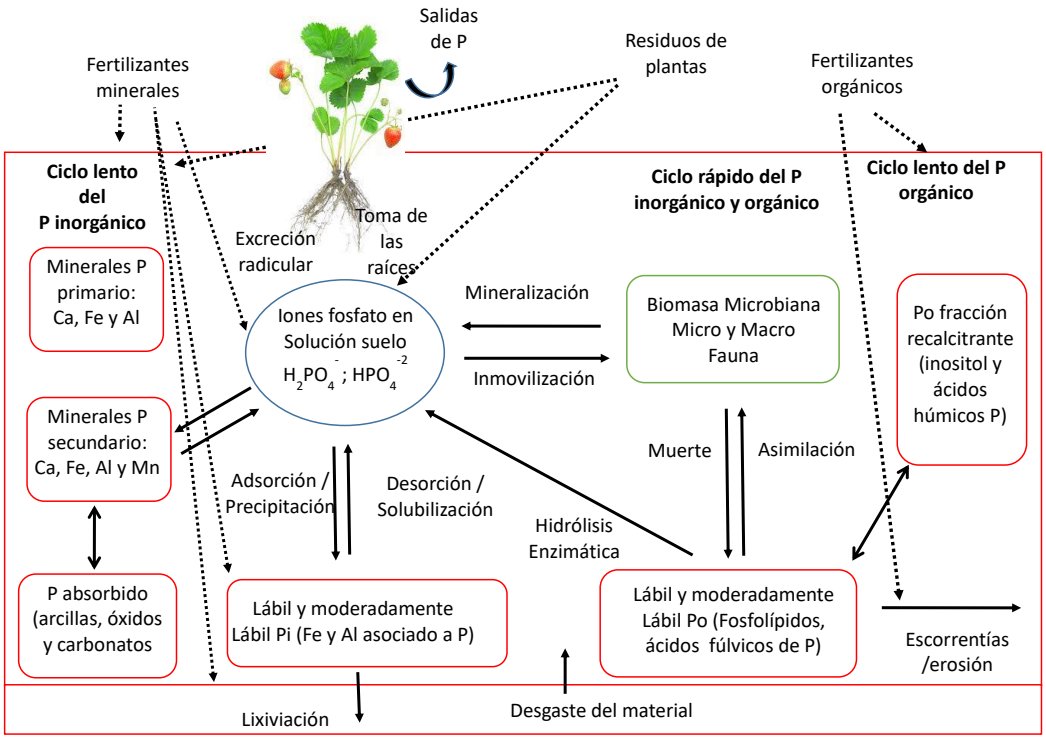


Figura 1-2. Transformaciones fisicoquímicos y biológicas del P en los sistemas suelo-microorganismos-planta y solución del suelo. Po: fósforo orgánico; Pi: fósforo inorgánico. La flecha de puntos indica la entrada externa de fósforo y la flecha sólida muestra transformaciones internas de fósforo. Adaptación de Zhu et al., 2018

La concentración del P en la solución del suelo es primeramente controlada por el equilibrio de la adsorción/desorción entre el Pi lábil, en la fase sólida (asociada con minerales cargados positivamente como óxidos de hierro y aluminio) definidas por las relaciones de concentración de equilibrio (Haynes and Mokolobate, 2001; Hinsinger, 2001). La adsorción (ligaciones de intercambio) ocurre cuando los iones de P reemplazan los grupos hidroxilo en la superficie de los óxidos de hierro y aluminio y los óxidos hidratados (Haynes and Mokolobate, 2001). La desorción es la liberación del P de estas mismas superficies hacia la solución del suelo. (Restrepo-Franco et al., 2015). Como resultado, el P en la solución suelo se repone fácilmente en respuesta a la absorción de la planta, a través de la desorción del P de la fracción sólida lábil (Cole et al. 1977, Whitelaw 2000). Sin embargo, solo una pequeña fracción de P en la fase sólida permanece en forma lábil, ya que puede adsorberse fuertemente al suelo o participar en reacciones de precipitación (Arcand y Schneidder, 2006).

También el P puede fijarse fuertemente y eventualmente precipitarse como variscita (mineral compuesto de fosfato de aluminio dihidratado) y espinela (mineral compuesto por óxidos de aluminio) en suelos ácidos, o con Ca^{2+} en suelos alcalinos (Whitelaw 2000). Los efectos de la precipitación del P son significativos en suelos con valores bajos de pH, donde el doble de la cantidad de P adicionado por área de superficie se fija en comparación con los suelos neutros o calcáreos (Whitelaw 2000).

El Po presente en la materia orgánica del suelo, puede constituir entre un 30 a 50% del P total en la mayoría de los suelos, aunque puede variar desde un 5% a un 95% (Zhu et al., 2018). Por lo general, el Po está presente como monoésteres de ortofosfato, incluidos los fosfatos de inositol y como diésteres de ortofosfato, polifosfatos y fosfonatos orgánicos (Bünemann, 2015). El contenido de Po depende de varios factores: clima, vegetación, textura, prácticas de fertilización, riego y drenaje, y uso del suelo. El tiempo de residencia media del Po en el suelo se ha estimado entre 350 y 2000 años (Kögel-Knabner, 2006).

Dentro del Po se puede clasificar en cuatro fracciones principales: lábil, moderadamente lábil, moderadamente recalcitrante (ácido fúlvico-P), y altamente recalcitrante (ácido húmico-P) (Bowman y Cole, 1978, Randriamanantsoa et al., 2015). Todas las fracciones se pueden transformar en fosfato disponible para las plantas a través de la mineralización mediada por

microorganismos, pero a diferentes velocidades. El Po lábil se mineraliza de forma relativamente rápida, mientras que el fosfato de inositol (hasta el 50% del Po) no es fácilmente mineralizable y llega a acumulase en grandes cantidades (Cerón y Aristizábal, 2012). La biomasa microbiana actúa como fuente y sumidero del P del suelo y es crítica para el ciclo de P (es decir, la mineralización de Po mediante transformaciones catalizadas por enzimas y la conversión de Pi en sus células vivas durante la inmovilización de P).

El proceso de liberación del Po a Pi se conoce como mineralización y en el suelo cuatro grupos de enzimas participan en esta transformación (Rodríguez et al., 2006):

i) Las fosfatasas ácidas no específicas, que llevan a cabo la desfosforilación de los enlaces fosfoéster o fosfoanhidro de la materia orgánica.

ii) Las fosfatasas alcalinas, son hidrolasas responsables de eliminar grupos fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides.

iii) Las fitasas, actúan específicamente provocando la liberación de fósforo del ácido fítico.

iv) Las fosfonatasas y carbono-fósforo liasas que pueden romper las uniones carbono-fósforo presentes en los organofosforados.

Las actividades enzimáticas que tienen mayor importancia en el suelo corresponden a las fosfatasas ácidas-alcalinas y las fitasas, debido a la presencia en el suelo de los sustratos sobre los que actúan de forma predominante. Se han señalado incrementos en la biodisponibilidad de P en el suelo cuando existen aumentos paralelos en la actividad microbiana. Los mecanismos involucrados en la solubilización-mineralización microbiana de las diferentes formas de fosfato insoluble incluyen procesos de acidificación, quelación, reacciones de intercambio, producción de ácidos y acción enzimática, en los que se destacan las BSF por su eficiencia en este proceso (Kishore et al, 2015).

1.2 Bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF)

Las BSF están involucradas en una variedad de procesos que afectan la transformación del P en el suelo y, por lo tanto, son parte integral del ciclo P del suelo (Behera et. al., 2014). En particular, estos microorganismos son capaces de transformar P insoluble en formas solubles (accesibles para las plantas) a través de procesos de solubilización y mineralización (Hilda y

Fraga, 1999). Probablemente sean la opción más ecológica y económica para mejorar la disponibilidad de P para las plantas (Owen et al., 2015). Por ello, ha llamado la atención de los agricultores, producirlos como inóculos y aplicarlos al suelo para mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas (Prabhu et al., 2019, Meena et al., 2017). Además, la capacidad de solubilización del P de los microorganismos se considera que es uno de los rasgos más importantes asociados en la nutrición del P en la planta (Behera et al., 2014).

Hay poblaciones considerables de bacterias BSF en el suelo y en la rizosfera de la planta (Sperber, 1958, Katznelson et al., 1962, Alexander, 1977). Dentro de los géneros de BSF más destacados se encuentran *Achromobacter, Aereobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Azotobacter, Bacillus, Bradyrhizobium, Burkholderia, Chromobacterium, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Flavobacterium, Klebsiella, Micrococcus, Pantoea agglomerans, Pseudomonas, Rhizobium, Salmonella, Serratia* y *Thiobacillus* (Zhu et. al., 2018), algunas de las cuales se referencian en la tabla 1-1 relacionandolas con el cultivo donde han sido empleadas y sus mecanismos de solubilización. En cuanto a los géneros de hongos solubilizadores de fosfatos más conocidos se encuentran *Alternaria, Aspergillus, Fusarium, Helminthosparium, Penicillium, Rhizopus, Sclerotium y* y Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) (Khan et al., 2007). Las BSF representan entre 1 y 50% de la población total microbiana del suelo, mientras que los hongos solubilizadores de P se encuentran entre 0,1 y 0,5% y en menor papel lo desempeñan los actinomicetos solubilizadores de P, destacándose los géneros *Streptomyces* y *Nocardia* (Khan et al., 2007).

Tabla 1-1 Bacterias solubilizadoras de fosfato más estudiadas

Bacteria	Cultivo	Mecanismos de solubilización de fosfatos	Referencia
Enterobacter agglomerans	Tomate *(Solanum lycopersicum)*	Producción de CO_2 y ácidos orgánicos	Kim et al., 1998
Pseudomonas prosekii	Nuez *(Juglans siggillataL.)*	Acidificación y quelación	Yu et al., 2011b
Pseudomonas chlororaphis *Bacillus megaterium*	Nuez *(Juglans siggillataL.)*	Producción de ácidos orgánicos	Yu et. al 2011 a
Pseudomonas stutzeri *Azospirillum brasilense*	Ají *(Capsicum annuum L.)*	Acidificación y quelación.	Abbasi et al., 2015
Rhizobium leguminosarum	Lechuga (*Lactuca sativa)* y maíz *(Zea mays)*	Actividad fosfatasas	Rodriguez y Fraga, 1999
Bacillus amyloliquefaciens	Maíz *(Zea mays)*	Actividad fitasa	Idriss et al., 2002
Pantoea agglomerans *Burkholderia anthina*	Fríjol *(Phaseolus vulgaris)*	Acidificación	Charana y Yoon, 2013
Pseudomonas fluorescens *Bacillus sp.*	*Arabidopsis thaliana*	Actividad fitasas	Ryu et al. 2005
Bacillus subtilis	Tabaco *(Nicotiana tabacum)* *Arabidopsis thaliana*	Actividad fitasas	Lung et al. 2005
Herbaspirillum sp *Burkholderia sp*	Arroz *(Oryza sativa L.)*	Acidificación	Estrada et al., 2013
Azospirillum sp, Bacillus sp y Enterobacter	Trigo *(Triticum aestivum L.)*	Producción de ácidos orgánicos	Tahir et al., 2013

Fuente: autor

De las BSF, se conoce que los géneros de *Pseudomonas, Azotobacter, Burkholderia, Bacillus y Rhizobium* aumentan la disponibilidad de P en el suelo (Jones y Oburger, 2011) y tienen la capacidad de solubilizar compuestos de fosfato inorgánico insolubles, tales como fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y fosfato de roca (Goldstein, 1986).

La capacidad de solubilización de P de diferentes BSF varía según la especie, la cepa, las propiedades del suelo (inherentes y estacionales) y las especies de plantas (Zhu et al., 2018).

Se ha informado hasta un aumento máximo de P disponible en el suelo del 208% en el cultivo del haba *(Vicia faba)* en relación a las plantas sin inocular, por la acción de hongos solubilizadores de fosfato (Wahid y Mehana, 2000). Sin embargo, de Freitas et al., (1997) encontraron que la aplicación de BSF *(Bacillus sphaericus, B. polymyxa y B. thuringiensis)* incrementaron significativamente el crecimiento de las plantas, pero no la captación de P. Otros estudios sugieren que las mezclas de diferentes bacterias solubilizadores de P (entre las especies *Pseudomonas chlororaphis, Bacillus cereus*, y *Pseudomonas fluorescens*) pueden ser más efectivas que utilizar organismos individuales (Yu et al., 2011a). Kim et al. (1998) reportaron que cuando; HFMA; *Glomus etunicatum* y BSF *(Enterobacter agglomerans)* se aplicaron juntos, la colonización microbiana del suelo y la respuesta de la actividad fosfatasa fueron más altas que cuando se usaron por separado, lo que sugiere una interacción sinérgica, aunque los mecanismos exactos no se entienden completamente. Es probable que el aumento adicional en P resultante de la inoculación dual se deba a una mayor solubilización de P por parte de BSF a través de la producción de ácidos orgánicos, la quelación de iones y el aumento de la permeabilidad de las células de la raíz, así como el apoyo al establecimiento y la función de HFMA (la colonización micorrízica altera la fisiología de las raíces y altera las poblaciones microbianas) (Suri et al., 2011).

1.2.1 Mecanismos de solubilización de fósforo por bacterias solubilizadoras de fósforo

Se han identificado los principales procesos del ciclo del P en el suelo que afectan las concentraciones de P en la solución como lo son: (1) disolución-precipitación (equilibrios minerales), (2) Sorción-desorción (interacciones entre P en solución y superficies sólidas del suelo), y (3) mineralización-inmovilización (conversiones de P mediadas biológicamente entre formas inorgánicas y orgánicas) (Sims y Pierzynski, 2005; Sharma et. al, 2013).

Sin embargo, los microorganismos que residen en la rizosfera tienen la capacidad de influir en el estado de los compuestos químicos presentes en el suelo mediante la absorción y liberación de iones orgánicos e inorgánicos. De esta manera, los microorganismos influyen en la disponibilidad de P en el suelo y juegan un papel importante en todos los tres principales procesos del ciclo del P en el suelo, descritos inicialmente (Sharma et al., 2013).

Para que ocurran estos procesos de disolución y disponibilidad de Pi, las BSF emplean mecanismos que permiten la solubilización y mineralización de P. Los tres mecanismos principales descritos por Sharma, et al., 2013 son:

1. Liberación de sustancias que disuelven minerales como aniones de ácidos orgánicos, iones hidroxilo, CO_2, sideróforos y protones.

2. Secreción de enzimas extracelulares (ejemplo la mineralización bioquímica de Po).

3. La liberación del P durante la degradación de sustratos (mineralización biológica).

Las plantas reciben el P asimilable cuando la tasa de solubilización de P (en el caso de los minerales) y mineralización (cuando se trata del Po ligado, desintegración de biomasa microbiana) excede la inmovilización de P (por formación de minerales, incorporación por absorción en biomasa microbiana) (Sharma, 2013). Los mecanismos de los microorganismos solubilizadores de fosfato se visualizan en el esquema de la figura 1-3.

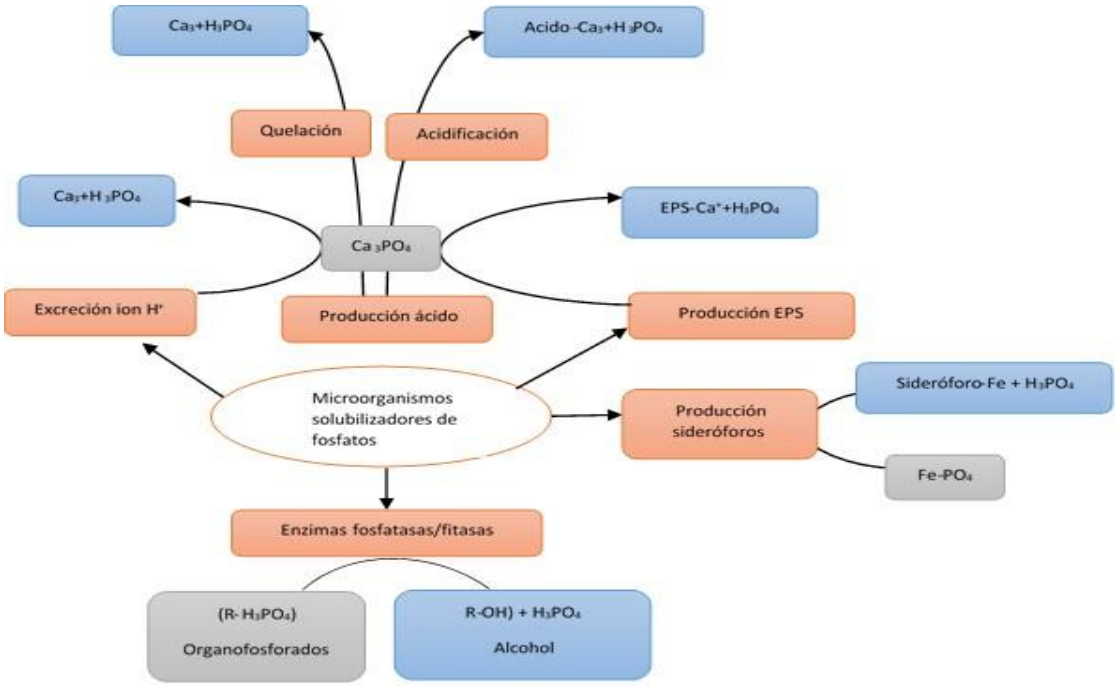


Figura 1-3. Mecanismos de solubilización de Pi y mineralización de Po por microorganismos. Adaptación de Phrabu et al., 2018

- Solubilización de fosfatos inorgánicos

Se dice que la producción de ácidos orgánicos (AO) es el principal mecanismo de solubilización del Pi. La producción de AO por BSF tiene acción directa en la acidificación del medio, quelación, precipitación y las reacciones de óxido-reducción en la rizosfera (Kucey et. al., 1989). Algunos AO producidos por los BSF son el acético, fórmico (ácidos monocarboxílicos); láctico, glucónico, glicólico (ácidos hidroxy monocarboxílicos); 2-ceto glucónico (cetoácido monocarboxílico); oxálico, succínico (ácidos dicarboxílicos); málico (hidroxiácidos dicarboxílicos); y cítrico (hidroxiácidos tricarboxílicos) en medios líquidos (Tabla 1-2). Entre los diferentes AO producidos por bacterias, el ácido glucónico ha sido considerado como el ácido clave para la solubilización de fosfato (Rashid et. al., 2004). La acción de los AO en la solubilización de minerales puede atribuirse además a que disminuyen el pH, y a la formación de complejos estables con Ca^{+2}, Mg^{+2}, Fe^{+3} y Al^{+3}. Estas reacciones cuando ocurren, previenen la fijación de los fosfatos que son añadidos al suelo como fertilizantes (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2009).

Tabla 1-2. Producción de ácidos orgánicos por bacterias solubilizadoras de fosfato

Acido orgánico	Ruta biosintética	Generos Bacterianos	Referencia
Acético	Oxidación incompleta de azúcares (fermentación acética)	*-Acetobacter aceti, Gluconobacter oxydans, Pseudomonas fluorescens*	Singh y Amberger (1998 a)
Oxálico	Ácidos tricarboxílicos	*-Pseudomonas fluorescens*	Singh y Amberger (1998 a)
Succínico	Ciclo del glioxilato y ácidos tricarboxílicos	*-Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens*	Liu et al. (1992)
Málico	Acidos tricarboxílicos	*-Bacillus megaterium*	Singh y Amberger (1998b)
Propiónico	Acidos tricarboxílicos	*-Bacillus megaterium*	Chen et al. (2006)
2-Cetoglucónico	Oxidación directa de la glucosa	*-Rhizobium leguminosarum, Rhizobium meliloti, Bacillus firmus*	Halder et al. (1990)
Glucónico	Oxidación directa de la glucosa	*-Erwinia herbicola, Pseudomonas Cepacia, Burkholderia cepacia*	Illmer y Schiner (1992), Liu et al. (1992) y Goldstein et al. (1993)
Málico 2-Cetogluconico	Oxidación directa de la glucosa	*-Rhizobium tropici*	Marra et al., 2015

Succínico/Láctico Glucónico	Oxidación directa de la glucosa	-*Acinetobacter* sp.	Marra et al., 2015
Fórmico		*Burkholderia cepacia*	Li et al, 2010

La producción de ácidos inorgánicos como el ácido sulfúrico, ácido nítrico y los ácidos carbónicos han sido reportados como mecanismos de solubilización de fosfatos (Rodríguez y Fraga, 1999), aunque se ha reportado que solubilizan menos cantidades de fósforo inorgánico (Pi). Es el caso de la hidroxiapatita, donde se ha informado, que el HCl pudo solubilizar menos P en esta fuente, que el ácido cítrico o el ácido oxálico al mismo pH (Sherma et al., 2013).

También se ha informado que la solubilización de fosfatos ocurre incluso en ausencia de producción de ácido, la acidificación del medio ocurre debido a la excreción de H^+, presentándose como un mecanismo alternativo de solubilización de fosfato inorgánico. La excreción de H^+ se origina por asimilación del NH_4^+, producción de H_2CO_3 en la respiración y extrusión de aniones de ácidos orgánicos (Prabhu et. al., 2018).

La producción de exopolisacáridos (EPS), tiene un efecto indirecto en la solubilización de P. Estos son producidos en gran parte por los microorganismos en respuesta al estrés. Los estudios sobre exopolisacáridos microbianos han revelado su capacidad para unirse con metales en el suelo. Por lo tanto, pueden influir en la solubilidad de los fosfatos metálicos en el suelo (Ochoa-Loza et. al., 2001). También a la producción de sideróroforos se le ha atribuido su influencia en la solubilización de fosfatos de hierro en el suelo, ya que los siderófos son sustancias secretadas por los microorganismos que muestran afinidad por la quelación del hierro. (Prabhu et al., 2019)

- Mineralización del fosfato orgánico

Los compuestos de Po presentes en el suelo son los ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfonatos, ácido fítico, polifosfonatos y fosfatos de azúcar. La mineralización de estos fosfatos orgánicos se produce en el suelo mediante la acción de enzimas microbianas como las fosfatasas o la fosfohidrolasa, las fitasas, la fosfonatasa y la C-P liasas. Las fosfatasas desfosforilan los enlaces fosfo-éster o fosfoanhidrido de la materia orgánica liberando los iones fosfato. En función de su pH óptimo se dividen en ácidas o alcalinas, ambas enzimas pueden ser producidas por las BSF dependiendo de las condiciones externas (Kim et al. 1998; Jorquera et al. 2008).

La enzima fitasa, hidroliza los compuestos de ácido fítico o mio-inositolfosfato liberando el P. La fosfonatasa y la C–P liasa hidrolizan los enlaces éster de los fosfonatos (p. Ej., fosfoenol piruvato, fosfonoacetato) y convierten los fosfonatos en hidrocarburos e iones fosfato para su asimilación (Phabru et al., 2019).

1.2.2 Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato en las plantas.

Las BSF desempeñan un papel importante en la nutrición vegetal a través del aumento de la absorción de P por las plantas. La aplicación de estas bacterias como inoculantes, son esenciales para la agricultura sostenible ya que fomentan el crecimiento y el rendimiento de las plantas y el suministro de nutrientes para las plantas, reduciendo así el uso de fertilizantes químicos (Rafi et al, 2019).

Diversos reportes han revelado el efecto en la promoción del crecimiento en las plantas por estos microorganismos (Sharma et al., 2013; Restrepo-Franco et al, 2015; Rafi et al., 2019). Esto como consecuencia de la producción de metabolitos benéficos que actúan indirectamente en la planta como fitohormonas y siderórofos (Tahir et. al., 2013).

Varios ensayos en macetas y en campo han demostrado que la aplicación de estas BSF, ya sea individual o combinadas con o sin fertilizantes fosfóricos mostraron un aumento en el rendimiento y la absorción de P del 10% al 27% (Rafi et al., 2019) e incrementaron el crecimiento y la producción de biomasa de varios cultivos como arroz, soya, maní, alfalfa, algodón, trigo y maíz, entre otros, (Patiño-Torres y Sanclemente-Reyes, 2014). Cepas de *Pseudomonas putida, P. fluorescens y P. stutzeri* han incrementado la elongación de raíces y tallos en tomate e incrementó los rendimientos en cultivos de papa y lechuga, (Fonseca, 2003; Indiragandhi et al., 2008); también aumentó el P asimilado por plantas de chile (Abbasi et al., 2015).

Además, el uso de BSF promueve el crecimiento de las plantas de otra manera, como acelerando la germinación de las semillas, mejorando la emergencia de las plántulas, aumentando la resistencia al estrés abiótico, protegiendo a las plantas de enfermedades y mejorando la morfología de las raíces (Adnan Muhammad et al., 2017). Walpola y Yoon (2013), estudiaron el efecto de dos cepas de BSF, *Pantoea agglomerans* y *Burkholderia anthina*,

observando que en condiciones de invernadero mejoraron la longitud del brote y la raíz, la materia seca del brote y la raíz, y la absorción de P de las plantas de frijol mungo.

Estos estudios con BSF, permiten evidenciar los beneficios de adoptar el manejo microbiano de la rizosfera para la producción agrícola sostenible. Observándose la mejora de la biodisponibilidad de fosfato para los cultivos, estimulación el crecimiento de las raíces y los brotes, así como un mayor peso de los brotes frescos y secos, la absorción de fosfato y una mejora significativa en los rendimientos de grano y materia seca (Rafi et al., 2019).

1.3 Generalidades en producción de forrajes.

El establecimiento de la pradera en un sistema ganadero, es de vital importancia porque constituye la fuente de alimento más abundante y económico para los rumiantes en los trópicos. La productividad de un animal en pastoreo refleja el balance entre sus requerimientos nutricionales (demanda) y la disponibilidad del alimento (oferta) (Muñoz, 2015).

En la obtención y utilización de pastos, intervienen un conjunto de factores, que se deben tener en cuenta en el momento del establecimiento de la producción de pastos, los más importantes son:

Calidad y estado del suelo; tipo de pasto o material forrajero utilizado; los animales que pastorean en él; el clima; y manejo.

Los forrajes están constituidos por agua, minerales, hidratos de carbono, lípidos y materiales nitrogenados. El primer parámetro a tener en cuenta es la cantidad de agua presente y su separación lo que conduce a la determinación de materia seca (MS), de la cual se puede sustraer el contenido de minerales, el porcentaje de materia orgánica (MO)- la cual está constituida por los hidratos de carbono y glúcidos- el material nitrogenado y los lípidos (Peters et. al., 2003; Eraso, 2014).

La asociación de gramíneas y leguminosas es importante porque confiere ventajas como mayores rendimientos que cada especie sembrada en monocultivo y se obtiene un forraje más nutritivo. Además el uso de consorcios de leguminosas y gramíneas pueden aumentar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo y reducir los costos y las aplicaciones de pesticidas y fertilizantes nitrogenados (Tambara et al., 2017).

Por ello, utilizar las leguminosas en asociación con gramíneas, representa una opción para solucionar el problema de la alimentación del ganado en el trópico porque mejora la palatabilidad del forraje y el valor nutricional como aumenta la productividad (Baumont et al., 2008; Olivo et al., 2016). Por tanto, es importante seguir evaluando las leguminosas en asociaciones y bancos de proteína, para generar información que le sirva al productor e incremente la rentabilidad de su empresa pecuaria.

1.4 Asociación de pastos

La asociación de especies en praderas es una práctica que permite principalmente obtener un alimento adecuado (proteína, carbohidratos) reflejándose en la mayor producción de carne y leche.

Según Percy (2012), las ventajas más importantes de los pastos asociados radican en:

- Evita el timpanismo o empanzamiento del ganado, por ser más digerible.
- Es más palatable y/o agradable para los animales.
- Mayor rendimiento de forraje (30 T (toneladas de masa seca)$^{-1}$corte^{-1}ha^{-1}) en comparación de solo leguminosa (15 T^{-1}corte^{-1}ha^{-1}).
- Evita la invasión de maleza porque al asociar pastos se consigue tener mayor cobertura de forraje, evitando el ingreso de luz y con ello el crecimiento de malezas.
- En el establecimiento y/o siembra de pastos las Poaceaes (*ryegrass*) ayudan a establecer con facilidad a la leguminosa.
- Disminuye la erosión de los suelos.
- Incrementa la producción de leche en un 10 a 20 %.

Las principales especies de pastos se dividen en dos grandes grupos: Poaceaes y leguminosas.

1.4.1. Poaceaes

Las Poaceaes o comúnmente llamadas gramíneas son aquellas plantas que presentan las hojas alargadas y angostas como: el maíz, la avena forrajera, cebada, dactylis, ryegrass, entre otras; estas plantas son ricas en carbohidratos que proporcionan calorías (energía), aportan la energía necesaria para que los animales tengan fuerza, puedan movilizarse, alimentarse y aprovechar dichos alimentos (Percy, 2012).

Las gramíneas se caracterizan por tener raíces en forma de cabellera, poco profundas, no resisten las sequías y por tanto, necesitan riegos permanentes (cada 8 a 10 días). Dentro del grupo de las gramíneas, las especies más utilizadas en el trópico alto Colombiano son: pasto kikuyo *(Cenchrus clandestinus)*, *ryegrass (Lolium multiflorum)*, avena forrajera *(Avena sativa)* y especies nativas como la falsa poa *(Holcus ianatus)* y el oloroso *(Humiria balsamífera)* (Franco, 2017).

- Ryegrass (*Lolium* spp.)

En la zona de Trópico alto, esta gramínea es la más utilizada específicamente en las regiones cundiboyances y en el departamento de Nariño. Sus ventajas comparativas con el kikuyo son la tolerancia a las heladas, la tolerancia al chinche de los pastos *(Collaria colombiensis)* y un mayor valor nutricional (Carulla, 2004).

Se caracteriza por su alto valor nutritivo, palatabilidad y digestibilidad siendo muy eficiente en el uso del N. Presenta formación de macollas, muy expansiva y agresiva que le permite cubrir bien el suelo y resistir fuertemente al daño por pisoteo y al pastoreo intensivo (Muñoz, 2015).

El contenido de carbohidratos no estructurales (CNE) se considera como el principal factor que influye sobre el crecimiento en pastos. El uso de las reservas que se almacenan en las raíces principalmente, se considera que afecta tanto el período de aparición de las hojas como la persistencia de la pastura, pues en caso de no brindar una recuperación de reservas adecuada a la planta, éstas se agotarán llevando a la pastura a un estado de degradación (Fulkerson, 2002).

La calidad nutricional de estas especies, varía entre ellas y poseen un mayor valor energético y potencial de consumo que otros pastos. Los valores de proteína en general son superiores a los del kikuyo en condiciones similares de manejo y la proporción de N ligada a la fibra en detergente ácido (FDA) es menor (Jaramillo *et. al,* 2014). Las fibras detergente neutro (FDN), son buenos indicadores del contenido de fibra en el forraje, lo que indica el grado de digestibilidad en el animal, mientras que el extracto etéreo permite determinar cuantitativamente la pequeña fracción de lípidos en las pasturas (Molano, 2012).

En la tabla 1-3, se indican las características nutricionales del pasto ryegrass.

Tabla 1-3. Valor nutricional promedio de muestras de pasto ryegrass de la sabana de Bogotá

Análisis principal	Unidad	Promedio	D.E	Mín.	Máx.
Materia seca	%	14.9	2.2	18.9	11.1
Proteína cruda[1]	% DM	26.3	4.4	29.8	16.7
Proteína soluble [1]	% DM	14.6	4.4	18.7	9.1
FDN[1]	% DM	47.4	9.4	67.9	36.0
FDA[1]	% DM	28.6	5.2	36.0	19.5
Cenizas[1]	% DM	12.4	0.6	12.8	11.9
Energía neta de lactancia[2]	(Mcal/ kg)[2]	1.6	0.6	1.9	1.4

[1] Datos expresados como porcentaje con base en materia seca. [2] Estimados basados en concentración de FDN (y = (1.12 - .00947FDN) x 2.2). Fuente: Carulla et al., 2004

1.4.2 Leguminosas

Una de las alternativas para mejorar la calidad de las praderas tropicales, es la introducción de leguminosas persistentes y compatibles con Poaceaes. La forma de utilizar las leguminosas, como elemento para mejorar la alimentación animal, ya sea en asociación con Poaceaes, como banco de proteína o en franjas, dependerá del programa de manejo y la disponibilidad de terreno en las unidades de producción. La asociación de Poaceaes con leguminosas, representa una opción económica, para mejorar la producción animal en las regiones tropicales (Rojas, *et. al.,* 2005). Esta asociación permite que las leguminosas le aporten N a las Poaceaes y al suelo en forma gradual.

Según Saldhana (2017), el N aportado por las leguminosas:

- Representa la gran mayoría del N que entra en los sistemas de producción por medio de la fijación biológica de N.
- Es de muy bajo costo y gran eficiencia frente al fertilizante de síntesis química.
- Las leguminosas obtienen el 90% del N de la atmósfera. Una pastura que produce 9.000 kg ha^{-1} de masa seca (MS) con 3% de N, necesita 270 kg ha^{-1} $año^{-1}$ de N, lo cual significa que la FBN representa 528 kg ha^{-1} $año^{-1}$ de urea.
- Para cada 1.000 kg ha^{-1}de MS se fijan aproximadamente 30 kg ha^{-1} de N. La transferencia de N a las gramíneas varía a lo largo del ciclo de la especie, el pastoreo, el porcentaje de leguminosas, y otros.
- Puede no ser suficiente. El fertilizante se debe aplicar a Poaceaes para complementar la fijación más no para sustituirla.

Las leguminosas son aquellas plantas que presentan hojas anchas y pequeñas, como la alfalfa, tréboles, fríjol, habas, entre otras; estas plantas son ricas principalmente en proteínas que aportan al crecimiento y producción de los animales (Percy, 2012). Se caracterizan por tener una raíz principal que se profundiza en el suelo, esta característica hace que los pastos que pertenecen a este grupo toleren mejor la sequía, pero también necesitan riegos permanentes para que puedan desarrollarse en menor tiempo (Percy, 2012)

- Trébol rojo (*Trifolium pratense L*.)

Es una leguminosa que requiere suelos de textura arcillosa y con alto contenido de materia orgánica, se puede adaptar desde los 2.200 a 3.900 m.s.n.m, y se asocia adecuadamente con ryegrass. Tiene una duración de 3 a 4 años según manejo y fertilización (Percy, 2012).

El trébol rojo se desarrolla bien en suelos de pH 5 a 7, fértiles, bien drenados, preferentemente de texturas pesadas y con buena capacidad de almacenaje de agua.

Los niveles de digestibilidad se hallan entre 65 y 80% dependiendo del estado fenológico de la planta. Cuando se presenta la defoliación, ésta afecta la digestibilidad de la materia seca, al parecer mientras más frecuente sean los cortes más alta es la digestibilidad. Plantas tiernas presentan mayor digestibilidad y consumo, pero menor producción de materia seca (Bernal, 1998)

El trébol rojo resiste un pastoreo fuerte, ya que sus reservas alimenticias son acumuladas en órganos de la planta que no pueden ser consumidos por el ganado en un pastoreo racional. Mediante los pastoreos se puede controlar el porcentaje de la leguminosa en la mezcla. Debido a que la poaceae pastoreada fuertemente tiene desventaja para iniciar el crecimiento por el consumo que hace el animal de sus reservas y el trébol tendrá estos nutrientes disponibles para iniciar una rápida formación del área foliar, siguiendo a esto una competencia por luz, llevando la mejor parte la especie con un área foliar mayor (Bernal,1998).

Referencias bibliográficas.

Abbasi M., Musa N. y Manzoor M. (2015). Mineralization of soluble P fertilizers and insoluble rock phosphate in response to phosphate-solubilizing bacteria and poultry manure and their effect on the growth and P utilization efficiency of chilli (*Capsicum annuum L.).* Biogeosciences. 12, 4607–4619. http://doi: 10.5194/bg-12-4607-2015

Adnan M. al. (2017). Phosphate-Solubilizing Bacteria nullify the antagonistic effect of soil calcification on bioavailability of phosphorus in alkaline soils. DOI: 10.038/s41598-017-16537-5

Alexander, M., (1977). Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons Inc., New York: SA.

Arcand M. y Shneider K. (2006). Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 78(4): 791-807. ISSN 0001-3765

Baumont, R., Aufrère, J., Niderkorn, V., Andueza, D., Surault, F., Peccatte, JR, y Pelletier, P. (2008). Species diversity in the feed: consequences on food value. Fillings, 194(6), 189-206.

Beauchemin, S., Hesterberg, D., Chou, J., Beauchemin, M., Simard, R.R., Sayers, D.E., (2003). Speciation of phosphorus in phosphorus-enriched agricultural soils using X-ray absorption near-edge structure spectroscopy and chemical fractionation contribution. J. Environ. Qual. 32, 1809–1819.

Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N., (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilisingmicroorganismin mangrove – a review. Biocatal. Agric. Biotechnol. 3, 97–110.

Bernal, J.E. (1998). Fertilización de pastos mejorados. En: R. Guerrero, editor, Fertilización de cultivos en clima frío. 2a ed. Monómeros Colombo Venezolanos S.A., Bogotá, COL. p. 278-328.

Bowman, R., Cole, C., (1978). An exploratory method for fractionation of organic phosphorus from grassland soils. Soil Sci. 125, 95–101.

Bünemann, E.K., Condron, L.M. (2007). Phosphorus and sulphur cycling in terrestrial ecosystems. In: Marschner, P., Rengel, Z. (Eds.), Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 65–92.

Bünemann, E.K., (2015). Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus – a review. Soil Biol. Biochem. 89, 82–98.

Carulla J. E., Cárdenas E., Sánchez N. y Riveros C. (2004). Valor nutricional de los forrajes más usados en los sistemas de producción lechera especializada de la zona andina colombiana En: Eventos y Asesorías Agropecuarias EU (ed.), Seminario Nacional de Lechería Especializada: “Bases Nutricionales y su Impacto en la Productividad”. Medellín, septiembre 1 y 2. pp 21 – 38.

Cerón R. L. y Aristizábal G. F. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIV No. 1. Pp 285-295.

Cole, C. V., Inis, G. S., Steward, J. W. B. (1977). Simulation mg/kg de suelo. of phosphorus cycling in semiarid Grassland. Ecology 58:1-1

CORPONARIÑO, (2009). Corporación autónoma regional del Nariño. Plan de acción trienal 2007-2009. Recuperado el 3 de diciembre de 2019 de: http://corponarino.gov.co/expedientes/planeacion/informe_gestion2008/informegestionfinal2008.pdf.

Charana W., Buddhi Y., Min-Ho. (2013). Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean *(Vigna radiata [L.] R. Wilczek).* Chilean journal of agricultural research, 73(3), 275-281. https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392013000300010.

De Freitas, J., Baneriee, M. y Germida, J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola *(Brassica napus L.).* Biology and fertility Soils Journal. 24. 358-364. Recuperado en: https://doi.org/10.1007/s003740050258

DeLuca, T.H., Gundale, M.J., MacKenzie, M.D., (2009). Biochar effects on soil nutrient transformations. In: Lehmann, J., Joseph, Stephen (Eds.), Biochar for Environmental Management: Science and Technology. Earthscan, London, UK, pp. 251–270.

Dollard, M.A., Billard, P. (2003). Whole-cell bacterial sensors for the monitoring of phosphate bioavailability. J. Microbiol. Methods 55, 221–229.

Encuesta Nacional Agropecuara – DANE (ENA). (20179. Boletín técnica ENA. Recuperado el 1 diciembre de 2019 de: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2017/boletin_ena_2017.pdf.

Eraso C. Y. (2014). Influencia de la fertilidad del suelo sobre la calidad composicional de la leche y pérfiles metabólicos en animales de lechería especializada en el trópico alto de Nariño. Tesis de maestría. Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia.

Estrada, G.; Divan V., De Oliveira D., Urquiaga S. y Baldani J. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. Plant Soil. 369:115–129. DOI 10.1007/s11104-012-1550-7

FEDEGAN. (2019). Plan Estratégico de la ganadería colombiana 2019. ISBN: 978-958-98018-1-9. Recuperado el 27 de noviembre de 2019 de: https://www.fedegan.org.co/plan-estrategico-de-la-ganaderia-colombiana-2019.

Franco V. Héctor, Cardona A. Luis, Mendoza N. (2017). Pasto Kikuyo *(Pennisetum clandestinum).* Recuperado en http://publimvz.galeon.com/. 30 de octubre del 2017

Frossard E., Brossard M., Hedley M.J., Metherell A. (1995). Reactions controlling the cycling of P in soils. In: Tiessend, H. (ed.) Phosphorus in the global Environment: Transfers. Cycles and managment. Jones Wiley and sons, Chichester, pp. 107-137.

Frossard, E., Achat, D.L., Bernasconi, S.M., Bünemann, E.K., Fardeau, J.C., Jansa, J., Morel, C., Rabeharisoa, L., Randriamanantsoa, L., Sinaj, S., Tamburini, F., Oberson, A., (2011). The use of tracers to investigate phosphate cycling in soil-plant systems. In: Bünemann, E., Oberson, A., Frossard, E. (eds.), Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 59–91.

Fonseca, MCC. (2003). Diversidade de *Pseudomonas* spp. *fluorescentes* no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), Seropédica – *RJ*. 136p. (Tesis doctoral. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro).

Goldstein, A. H., R. D. Rogers, and G. Mead. (1993). Separating phosphate from via bioprocessing. Biotechnology 11: 1250-1254.

Halder, A. K., A. K. Mishra, P. Bhattacharya y P. K. Chakrabartty. (1990). Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium.* J. Gen. Appl. Microbiol. 36: 81-92.

Haynes, R.J., Mokolobate, M.S., (2001). Amelioration of Al toxicity and P deficiency in acid soils by additions of organic residues: a critical review of the phenomenon and the mechanisms involved. Nutr. Cycl. Agroecosyst. 59, 47–63.

Hilda, R. y Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances 17, 319–359.

Hinsinger, P., (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant Soil 237, 173–195.

Idriss E. E., Makarewicz O., Farouk A., Rosner K., Greiner R., Bochow H., Richter T. and Borriss R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. Microbiology, 148, 2097–2109

Illmer, P., Schiner, F. (1992).Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biology and Biochemistry 24, 257–263

Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Sa TM. (2008). Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Curr Microbiol 56:327–333

Jaramillo, R. (2012). Manejo de la fertilidad en suelos volcánicos (Andisoles). International plant nutrition institute. Ecuador. Recuperado el 19 de octubre de 2017 de: http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/0/7750DA31D58BAF3605257ABC005DEE3E/$FILE/Andisoles.pdf. 12-11-2017

Jones, D.L., Oburger, E. (2011). Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. In: Bünemann, E., Oberson, A., Frossard, E. (eds.), Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 169–198.

Jorquera MA, Hernandez MT, Rengel Z, Marschner P, Mora MD. (2008). Isolation of culturable phosphor bacteria with both phytate-mineralization and phosphate solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. Biol Fertil Soils 44:1025–1034

Katznelson, H., Peterson, E.A., Rovatt, J.W., (1962). Phosphate dissolving microoganisms on seed and in the root zone of plants. Canadian Journal of Botany 40, 1181–1186.

Kaur G, Reddy MS. (2014). Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocational sites. European Journal of Soil Biology. 61: 35-40.

Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. Agron. Sustain. Dev. 27, 29–43.

Khan, M.S., Zaidi, A., Ahmad, E. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In: Khan, M.S., Zaidi, A., Musarrat, J.

(eds.), Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphos Technology. Springer International Publishing, Cham, pp. 31–62.

Kim KY, Jordan D, McDonald GA.(1998). Enterobacter agglomerans, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. Soil Biol Biochem 30:995–1003

Kishore N., Pindi PK, Ram RS. (2015). Phosphate-solubilizing microorganisms: a critical review. In: Bahadur B. et al (eds). Plant Biology and biotechnology: volume I, plant diversity, organization, function and improvement. Springer, India. Recuperado en https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_12

Kögel-Knabner I. (2006) Chemical structure of organic N and organic P in soil. In: Nannipieri P, Smalla K, editors. Nucleic Acids and Proteins in Soil. Berlin.: Springer Verlag; p. 23-48.

Kucey RM. (1989). Phosphate solubilising bacteria and fungi from various cultivated and virgin Alberta soils. Can J Soil Sci. 1989;63:671e8

Leaungvutiviroj C, Ruangphisarn P, Hansanimitkul P, Shinkawa H, Sasaki, K. (2010). Development of a new biofertilizer with a high capacity for N2 fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. Biosci Biotechnol Biochem. 74(5):1098-1101.

Li, B., Brett, M.T., (2013). The influence of dissolved phosphorus molecular form on recalcitrance and bioavailability. Environ. Pollut. 182, 37–44.

Li W.C., Ye Z. H. y Wong M. H. (2010). Metal mobilization and production of short-chain organic acids by rhizosphere bacteria associated with a Cd/Zn hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*. Plant Soil journal. 326:453–467. http://doi.10.1007/s11104-009-0025-y.

Liu, T. S., L. Y. Lee, C. Y. Tai, C. H. Hung, Y. S. Chang, J. H. Wolfram, R. Rogers, and A. H. Goldstein.(1992). Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. J. Bacteriol. 174: 5814-5819

Liu, F.-P., Liu, H.-Q., Zhou, H.-L., Dong, Z.-G., Bai, X.-H., Bai, P., Qiao, J.-J., (2014a). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut *(Areca catechu)* and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils. Biol. Fertil. Soils 50, 927–937.

Liu, J., Yang, J., Liang, X., Zhao, Y., Cade-Menun, B.J., Hu, Y., (2014b). Molecular speciation of phosphorus present in readily dispersible colloids fromagricultural soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 78, 47–53.

Lung SC, Chan WL, Yip W, Wang L, Yeung EC, Lim BL. (2005). Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and Arabidopsis roots enhances phosphorus utilization. Plant Sci 169(2):341–349

Marra L. et. al. (2015). Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. Brazilian Journal of Microbiology 46, 2, 367-375. Recuperado en: http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246246220131102

Meena S. V., Mishra K. P., Bisht K. J., Pattanayak A. (2017). Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture. Volume 2: Applications in Crop. Springer Nature. http://doi.10.1007/978-981-10-5343-6

Molano G. M. (2012). Caracterización nutricional de forrajes tropicales usando espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS). Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado en: http://www.bdigital.unal.edu.co/10565/1/7409506.2012.pdf. Palmira, Valle. 7-20

Muñoz-Mena. (2015). Planificación forrajera de fincas lecheras pertenecientes al círculo de excelencia II de FEDEGAN, como herramienta para el mejoramiento de la competitividad ganadera del departamento de Nariño. Universidad de Nariño. Recuperado enhttp://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/90970.pdf

Ochoa-Loza F.J., Artiola J.F., Maier R.M. (2001). Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant J Environ Qual, 30 (2), pp. 479-485

Olivo, C. J., Santos, J. C. D., Quatrin, M. P., Simonetti, G. D., Seibt, D. C., & Diehl, M. S. (2016). Forage mass and nutritive value of bermuda grass mixed to forage peanut or common vetch. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, *38*(3), 255-260.

Owen, D., Williams, A.P., Griffith, G.W., Withers, P. (2015). Use of commercial bioinoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. Appl. Soil. Ecol. 86, 41–54.

Paredes-Mendoza M. y Espinosa-Victoria D. (2009). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. Terra latinoamericana 28: 61-70. Montecillo, México.

Patiño-Torres C. O. y Sanclemente-Reyes O. E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. 10, *(2)*, julio-diciembre, 2014, pp. 288-297

Prabhu N., Borkar S., Garg S. (2019). Chapter 11: Phosphate solubilization by microorganisms: overview, mechanisms, applications and advances. Recuperado en: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00011-2.

Pérez, A., Rojas, S., Montes, J., Donicer, V. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biologica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el caribe colombiano. Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA, 3(2), 366-385

Percy, Ch. C. (2012). Cultivo de pastos. Manual práctico para productores. Sn Power,swisscontact (ed). Lima, Perú. 7-16. p.31-39. Recuperado en http://www.swisscontact.org/fileadmin/user_upload/COUNTRIES/Peru/Documents/Publications/MANUAL_PASTOS_CULTIVADOS.pdf.

Pérez, E., Sulbarán, M., Ball, M., Yarzábal, L., (2007). Isolation and characterization of mineral-phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. Soil Biol. Biochem. 39, 2905–2914.

Peters M., Franco I., Schmidt A. y Hincapié B. (2003). Especies forrajeras multipróposito: opciones para productores de Centroamérica. Publicación CIAT N° 333. Cali, Colombia. 113p

Rafi M., Krishnaveni M.S.; Charyulu P.B.B.N. (2019). Chapter 17 - Phosphate-Solubilizing Microorganisms and their emerging role in Sustainable Agriculture. recent developments in Applied Microbiology and Biochemistry, 223-233. doi:10.1016/B978-0-12-816328-3.00017-9

Randriamanantsoa, L., Frossard, E., Oberson, A., Bünemann, E.K., (2015). Gross organic phosphorus mineralization rates can be assessed in a Ferralsol using an isotopic dilution method. Geoderma 257-258, 86–93.

Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alam S, Farooq L. (2004). Organic acids production and phosphate solubilisation by phosphate solubilising microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pakistan J Biol Sci. 7(2):187e96.

Restrepo, M. León. (2008). Pastos de corte para el trópico: Colombia. Recuperado de http://www.agro20.com/profiles/blogs/2015296:BlogPost:25015. Noviembre 7 del 2017.

Restrepo-Correa S. P, Pineda-Meneses E. y Ríos-Osorio L. (2017). Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: una revisión sistemática. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecuaria. 18(2):335-351. Recuperado en: DOI: http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:635

Restrepo-Franco G. M, Moreno S., De la Fe-Pérez, et al. (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(1).63-76. http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/bacterias-solubilizadoras-de-fosfato-y-sus potencialidades-de-uso-en-la-promoci%C3%B3n-del

Rodríguez H, Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. 17: 319-39.

Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and Soil; 287: 15-21

Rojas, Hernández S., Olieveras Perez J., Jimeno, Guillén, Hernández Castro. (2005). Manejo de praderas asociadas de gramíneas y leguminosas para pastoreo en el trópico. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. Vol. VI, Nº 5, Mayo. México.

Ryu CM, Hu CH, Locy RD, Kloepper JW. (2005). Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. Plant Soil 268:285–292

Saldhana S. (2017). Mezclas forrajeras. Recuperado en http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/PASTURAS%20CRS/11%20%20Mezclas%20forrajeras.pdf. 8 noviembre 2017.

Shahid, M., Hameed, S., Imran, A., Ali, S., van Elsas, J.D., (2012). Root colonization and growth promotion of sunflower *(Helianthus annuus L.)* by phosphate solubilizing *Enterobacter* sp. Fs-11. World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 2749–2758.

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A., (2013). Phosphate Solubilizing Microbes: Sustainable Approach for Managing Phosphorus Deficiency in Agricultural Soils. 2. SpringerPlus, p. 587.

Sims JT, Pierzynski GM. (2005). Chemistry of phosphorus in soil. In: Tabatabai AM, Sparks DL (eds) Chemical processes in soil, SSSA book series 8. SSSA, Madison, pp 151–192

Singh, C. P. y A. Amberger. (1998a). Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate. Bioresour. Technol. 63: 13-16.

Singh, C. P. y A. Amberger. (1998b). Solubilization of rock phosphate by humic and fulvic acids extracted from straw compost. Agrochimica 41: 221-228.

Sperber JI. (1958). Solution of apatite in soil microorganisms producing organic acids. Aust J Agric Res; 9(6):782e7.

Suri, V.K., Choudhary, A.K., Chander, G., Verma, T.S., Gupta,M.K., Dutt, N. (2011). Improving phosphorus use through co-inoculation of vesicular arbuscularmycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria in maize in an acidic alfisol. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 42, 2265–2273.

Tahir M., Mirza M. S., Zaheer A., Rocha D. M., Smidt H., Hameed S. (2013). Isolation and identification of phosphate solubilizer *Azospirillum, Bacillus* and *Enterobacter* strains by 16SrRNA sequence analysis and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). Australian Journal of Crop Science. 7(9):1284-1292

Tambara C.A, Sippert M.R., Jauris G. C., Flóres J. L., Henz E. L., Velho J.P. (2017). Acta Scientiarum. Animal Sciences. V. 39, n. 3, p. 235-241

Vazquez P., Holguín G., Puente M. E., Lopez-Cortes A., Bashan Y. (2000). Phosphate solubilising microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biol Fertil Soils, 30 (5–6), pp. 460-468

Usha S, Padmavathi T. (2013). Effect of plant growth promoting microorganisms from rhizosphere of Piper nigrum L. Int J Pharm Bio Sci. 4(1):835-846.

Whitelaw MA. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilising fungi. Adv Agron 69:99e151.

Withers, P.J.A., Edwards, A.C., Foy, R.H. (2001). Phosphorus cycling in UK agriculture and implications for phosphorus loss from soil. Soil Use Manag. 17, 139–149.

Whiting SN, de Souza MP, and Terry N. (2001). Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. Environ Sci Technol 35:3144–3150. http://doi: 10.1021/es001938v

Wahid, O. and Mehana, T. (2000). Impact of phosphate-solubilizing fungi on the yield and phosphorus-uptake by wheat and faba bean plants. Microbiological research. 155. 221-7. 10.1016/S0944-5013(00)80036-1.

Walpola, B.C., Yoon, M., (2013). Phosphate solubilizing bacteria: assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). Chilean J. Agric. Res. 73, 275–281.

Yan, Y.P., Liu, F., Li,W., Liu, F., Feng, X.H., Sparks, D.L., (2014). Sorption and desorption characteristics of organic phosphates of different structures on aluminium (oxyhydr) oxides. Eur. J. Soil Sci. 65, 308–317.

Yu, X., Liu, X., Zhu, T.H., Liu, G.H., Mao, C., (2011a). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. Biol. Fertil. Soils 47, 437–446.

Yu, X., Liu, X., Zhu, T.H., Liu, G.H., Mao, C., (2011b). Co-inoculation with phosphate-solubilzing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. European Journal of Soil Biology. 112-117.

Zhu J., Li M., Whelan M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. Science of the Total Environment. 612. 522–537. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095

2. Problema de investigación y objetivos

2.1 Problema de investigación

2.1.1 Planteamiento del problema

La base de la alimentación de la ganadería especializada en leche del Trópico Alto Nariñense (2.700 a 3.200 m.s.n.m.) está soportada por la oferta de biomasa de praderas compuestas por pasto kikuyo *(Cenchrus clandestinus)* o en asociaciones kikuyo–tréboles blanco y rojo *(Trifolium repens L.* y *Trifolium pratense L*. respectivamente) y en algunas regiones con ryegrass *(Lolium* sp*)* (Castro, 2017). Generalmente son praderas con deficiencias en su manejo y baja fertilización, lo que lleva a una producción animal baja y fluctuante, dependiendo de las condiciones climáticas y los precios de los insumos involucrados tanto en el manejo de los pastos como en la alimentación del hato. Además, este manejo deficiente en la relación suelo-microrganismo-planta-animal ha generado un balance nutricional negativo por la limitada oferta y calidad del alimento para el ganado (Castro et. al., 2017).

Adicional a esto, los suelos de las praderas de estas zonas han registrado alta degradación, pérdidas en fertilidad y afectación de las propiedades físicas, con aumentos en compactación y reducción en el flujo de aire, agua y nutrientes en el suelo, que se traducen en baja capacidad de transporte de nutrientes y absorción de los mismos por la planta. Toda esta problemática presentada en el manejo del suelo hace que el ganadero acuda permanentemente al uso de concentrados comerciales que incrementan de manera notable los costos de alimentación y suplementación, que en ocasiones llegan hasta niveles del 46% del costo de producción (Castro, 2017).

Los suelos de la zona de trópico alto del departamento de Nariño son clasificados según lo establecido por “Soil Taxonomy” dentro del orden Entisol, siendo suelos fuertemente ácidos, muy superficiales y con muy alto contenido de aluminio (Erazo 2014). Asimismo, por ser un suelo derivado de materiales volcánicos (cenizas y basaltos) le confiere alta actividad biológica, alta capacidad de intercambio cationico dependiente del pH y la saturación de bases es baja. También se caracteriza por una alta capacidad buffer y alta retención de fosfatos, en razón de tener abundantes contenidos de aluminio y hierro activos (IGAC, 2004).

El desarrollo de nuevas estrategias de fertilización fosfatada donde se incluyan la aplicación de BSF en asociaciones de leguminosas y pastos, podría conducir a una reducción sustancial en la aplicación de fertilizantes de síntesis química que conllevaría a una disminución de los costos de producción, permitiendo la transformación del sistema ganadero en un sistema más sostenible.

2.1.2 Justificación

Los esquemas de alimentación de los sistemas de lechería especializada del trópico alto colombiano están basados en el uso de forrajes. Las gramíneas predominantes en estos sistemas son el kikuyo *(Cenchrus clandestinus)* y el ryegrass *(Lolium sp.)* (Carulla y Ortega, 2016), mientras que las leguminosas son el trébol blanco *(Trifolium repens)* y rojo *(Trifolium pratense)*, principalmente (Vargas et al., 2018). La incorporación de ryegrasses y tréboles, se ha promovido en las pasturas, ya que son menos sensibles a las bajas temperaturas y presentan un valor nutricional mayor respecto al kikuyo (Fulkerson et al., 2007). Sin embargo, los ryegrasses y tréboles tienen mayores requerimientos en la calidad química y física del suelo, en los niveles de fertilización, el contenido de humedad y en el manejo del pastoreo (Bernal, 1998). Por lo tanto, para estos forrajes se requiere una adecuada fertilización la cual debe ser completa y equilibrada, para conseguir buena alimentación para el ganado, y eficiencia económica para el ganadero (Legarda-López, et al. 2015). Es bien conocido, que las limitaciones de P también son una importante restricción de productividad en muchos sistemas de pastizales naturales (Augustine et al., 2003) y manejados (Bünemann et al., 2011). Esto debido, a la alta capacidad de fijación de P de la mayoría de los suelos y la baja eficiencia de uso de P (alrededor del 10-15%) de la mayoría de los cultivos agrícolas, lo cual significa que el aporte de P excedente de los fertilizantes tiende a acumularse en los suelos (Withers et al., 2001).

Muchos microorganismos del suelo tienen la capacidad de transformar el P insoluble en formas asimilables para las plantas, con lo que contribuye a su disponibilidad en el suelo; entre ellos se destacan, las BSF que constituyen una excelente alternativa para reducir la cantidad de fertilizantes aplicados a diferentes cultivos (Kaur y Reddy, 2014). Estas bacterias tienen la capacidad de tomar los compuestos insolubles del fósforo inorgánico (Pi) y orgánico (Po) y transformarlos en formas solubles (Jones and Oburger, 2011; Zhu et al., 2018).

Las formas dominantes del ión ortofosfato presentes en el suelo dependen del pH (Zhu et al., 2018). A un pH entre 4,0 y 6,0, está presente como ión $H_2PO_4^-$, que puede ser absorbido por las plantas debido a su solubilidad en agua. Cuando el pH incrementa a 6,5 y 7,5 está presente principalmente como $H_2PO_4^-$, HPO_4^{-2} (puede ser absorbida por las raíces de las plantas en menor proporción que la primera) (Restrepo-Franco et al, 2015) y PO_4^{-3}, viene siendo la forma más dominante (Yadav y Verma, 2012).

Por toda esa variabilidad de formas presentes de los compuestos fosfóricos en el suelo, se ha generado la necesidad de estudiar las bacterias con capacidad de solubilizar y mineralizar P, para presentar una solución al problema de la nutrición fosfatada en pasturas del tropico alto. Por ello, las BSF representan una alternativa para optimizar la nutrición en las plantas, ya que, al transformar el P insoluble a formas de fosfato más lábiles en el suelo, mejora la nutrición fosfatada en las plantas (Bashan et al, 2013a), contribuyendo a su vez a la reducción de la cantidad de fertilizantes de síntesis aplicados a los sistemas agrícolas. Las BSF incluyen una amplia cantidad y diversidad de géneros. Los principales mecanismos para mejorar la nutrición fosfatada por las BSF son: acidificación del medio, formación de un complejo metal en solución, producción de enzimas fosfatasas, entre otras (Bashan et al, 2013a; Restrepo-Franco, 2015; Sharma et al. 2013). Sin embargo, se requiere profundizar en estudios sobre BSF que tengan mayor potencial en el proceso de solubilización en sistemas de producción ganaderos y en sus mecanismos de acción.

2.1.3 Hipótesis

La inoculación de BSF en la asociación ryegrass-trébol rojo permite reducir la dosis de fertilización fosfatada de síntesis química.

2.2 Objetivos

2.2.1 Obetivo general

Evaluar el efecto potencial de BSF en la disminución de la dosis de fertilización mineral fosfatada en la asociación ryegrass-trébol rojo del departamento de Nariño

2.2.2 Objetivos específicos

Seleccionar BSF asociadas a plantas de ryegrass y trébol rojo bajo condiciones limitantes de fosforo en el suelo.

Evaluar el efecto de la inoculación de las cepas bacterianas seleccionadas utilizando diferentes dosis del fertilizante soluble en la asociación ryegrass-trébol rojo bajo condiciones de invernadero.

3. Caracterización de la capacidad de solubilización y mineralización de P de las cepas en estudio.

Resumen

Los sistemas de ganadería se basan principalmente en el uso de forrajes, siendo la siembra de ryegrass en asociación con el trébol rojo un alimento equilibrado para los rumiantes. Sin embargo, estos suelos tienen una alta retención de fosfato, lo que limita la eficiencia de los fertilizantes fosfatados. Las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) juegan un papel fundamental en la movilización del P en el suelo, convirtiendo compuestos insolubles del P en fosfatos asimilables para las plantas. El objetivo de este estudio fue seleccionar BSF en plantas de ryegrass y trébol rojo bajo condiciones limitantes de P en el suelo y evaluar su potencial como promotores de crecimiento vegetal en condiciones de invernadero. Diez BSF fueron inoculadas en plantas de ryegrass y trébol rojo junto con roca fosfórica (RF). Las cepas corresponden a: *Beijerinckia* sp. 37, *Bacillus* sp. XT14, *Stenotrophomonas* sp. A2, *Pseudomonas* spp A1, N3 y N7, *Herbaspirillum* sp. AP21, *Azospirillum* sp. D7 y *Rhizobium* spp. B02 y T88. *Rhizobium* sp. T88 y *Herbaspirillum* sp. AP21 se seleccionaron por presentar incrementos significativos en biomasa seca foliar de 20,31% y 44,8% en ryegrass y trébol rojo respectivamente, frente al control sin inoculación. Adicionalmente, se cuantificó el PO_4^- soluble y las actividades de las enzimas fosfatasa ácida - alcalina en medio líquido con fosfato tricálcico y RF. Se alcanzaron mayores valores PO_4^- en el medio que contenía fosfato tricálcico (3,67 mg P L^{-1}) por *Herbaspirillum* sp. AP21 y mayor actividad fosfatasa alcalina que ácida en presencia de RF. *Herbaspirillum* sp. AP21 obtuvo 125% de eficiencia de mineralización del fitato y produjo sideróforos. Estos resultados muestran la capacidad de solubilizar la RF y promover el crecimiento vegetal en condiciones de poca disponibilidad de P en el suelo. Por lo tanto, las BSF seleccionadas pueden ser una alternativa en el manejo del P en praderas de Nariño.

Palabras claves: roca fosfórica, *Rhizobium, Herbaspirillum*, actividad fosfatasa, sideróforos, fosfato soluble.

3.1 Introducción.

El Fosforo (P) es un nutriente importante que limita el crecimiento de las plantas, que a diferencia del nitrógeno (N) no existe una reserva atmosférica que pueda ser aprovechable biológicamente (Simpsons et al., 2011). El P interviene en el desarrollo radical, formación del tallo, flores, semillas y madurez del fruto. Por ende, es determinante en la producción de los cultivos (Sharma et al., 2013). La dinámica del P en el suelo se caracteriza por la fisicoquímica y procesos biológicos (inmovilización y mineralización). Gran cantidad de P aplicado como fertilizante se inmoviliza por reacción con Al^{+3} y con Fe^{+3} altamente reactivos en suelo ácidos (Gustafsson et al., 2012; Roberts y Johnston, 2015; Yadav y Verma, 2012). Debido a la fijación de fosfato, la eficiencia de uso de los fertlizantes fósforicos sintéticos agregados por las plantas es solo del 15% en el primer año y del 1 al 2% en los años siguientes (Kishore et al., 2015). Por su dinámica en el suelo, la concentración de P disponible en el suelo es de solo 0,1% del P total (Sherma et. al., 2013). De este modo, en la actualidad se aplican altas dosis de fertilizantes fosfatados de síntesis química para mantener y mejorar producción agropecuaria. Sin embargo, estos suelen ser caros y en el peor de los casos pueden contaminar el suelo acumulándose como sales que evitan el intercambio catiónico, deteriorando su calidad (Cordell et al., 2009).

El uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) en la actualidad representa una alternativa sostenible ejerciendo un rol importante en la dinámica del P en el suelo por la capacidad que tienen de transformar el P insoluble en formas asimilables para las plantas (Rodríguez and Fraga, 1999; Khan et al., 2009). Dicho aumento en la disponibilidad para las plantas se genera gracias a la producción de ácidos orgánicos (AO) (glucónico, cítrico, málico, oxálico, entre otros) que se producen por la acción de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) (Marra et. al., 2015). Las bacterias que se asocian con la producción de AO que solubilizan fosfato son generalmente Rizobacterias entre las que se encuentran: *Bacillus* sp*.,* (Bano y Musarrat*,* 2003; Wan y Wong 2004), *Stenotrophomonas* sp*., Burkholderia,* (Barra et al., 2018; Mora et al., 2017), *Pseudomonas* sp*.,* (Fernández et al., 2012; Giles et al., 2014), *Rhizobium* sp*.,* (Sridevi y Mallaiahl, 2009), *Vibrio proteolyticus, Enterobacter aerogenes* (Mora et al., 2017) *y Streptomyces* sp*.,* (Dastager & Damare, 2013), *Herbaspirillum* spp., (Estrada et al., 2013), entre otros. Así mismo, algunas BSF intervienen en la conversión del P orgánico a formas inorgánicas por tener la capacidad de sintetizar enzimas como fosfatasas (Acidas y/o alcalinas) y fitasas (Behera et. al., 2014). Entre los atributos asociados a la disponibilidad de P

gracias a la actividad microbiana de las BSF en el suelo está la fijación bilógica de N, la resistencia a enfermedades, producción de fitohormonas y sideróforos entre otros, los cuales conllevan a mejorar la productividad y calidad de los cultivos (Kumawat et. al., 2017).

La rentabilidad de la producción de leche en zonas de trópico alto del Departamento de Nariño (Colombia), se sustenta en las prácticas de manejo del pasto ryegrass *(Lolium* sp*.)* en asociación con trébol rojo (*Trifolium pratense* L.*)*, los cuales constituyen la fuente de alimento más nutritiva y económica que puede consumir un rumiante (Percy, 2012). Sin embargo, los suelos de esta zona se caracterizan por su alta degradación, bajos contenidos de P y poca fertilidad, afectando la producción de forraje en su calidad y cantidad generando poca rentabilidad y sostenibilidad de la ganadería (Castro et al. 2017).

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de 10 cepas con potencial biofertilizante en la producción de biomasa seca del pasto ryegrass one50 y trébol rojo en un suelo suplementado con roca fosfórica (RF). Adicionalmente se caracterizó *in vitro* el potencial de las cepas de aumentar la disponibilidad del P.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Preparación de los inoculos usados en los experimentos

Las bacterias empleadas para este estudio corresponden a 10 cepas procedentes del Banco de Germoplasma de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia). Estas bacterias fueron seleccionadas con base a estudios previos *in vitro* relacionados con su capacidad de promoción de crecimiento vegetal en actividades como producción de sideróforos, ácido indolácetico, deaminasa de ACC, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos (Moreno-Galván et al., 2020; Mendoza y Bonilla, 2014; otros resultados sin publicar).

Las cepas fueron previamente identificadas molecularmente mediante la secuenciación parcial del gen 16S rRNA utilizando los primers universales 27F (5´-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3´) y 1492R (5´- TACGGCTTACCTTGTTACGACTT-3´) como lo describen Calheiros et al. (2010) (Tabla 3-1).

Tabla 3-1. Características de las cepas utilizadas en el estudio

Cód. de accesión	Identificación molecular	Procedencia	Cultivo	Referencia
AP21	*Herbaspirillum* sp.	Tejido vegetal	Kikuyo *(Cenchrus clandestinus)*	Cortés-Patiño et al, submitted.
D7	*Azospirillum* sp.	Tejido vegetal	Kikuyo *(Cenchrus clandestinus)*	Cortés-Patiño et al, submitted".
XT14	*Bacillus* sp.	Rizósfera	Pasto guinea *(Megathyrsus maximus)*	Moreno et al, 2020; Moreno-Galván et al, submitted
T88	*Rhizobium* sp.	Nódulos	Trébol rojo *(Trifolium pratense)*	Sin publicar
B02	*Rhizobium* sp.	Nódulos	Fríjol caupí *(Vigna unguiculata)*	Mendoza y Bonilla, 2014; Romero-Perdomo et al, submitted
37L	*Beijerinkia* sp.	Rizósfera	Kikuyo *(Cenchrus clandestinus)*	Romero-Perdomo et al 2019"
A1	*Pseudomonas* sp.	Tejido vegetal	Kikuyo	Sin publicar
A2	*Stenotrophomonas* sp.	Tejido vegetal	*(Cenchrus clandestinus* llantén *(Plantago major)*	
N3	*Pseudomonas* sp.	Raíz	Llantén *(Plantago major)*	Sin publicar
N7	*Pseudomonas* sp.	Suelo	Kikuyo *(Cenchrus clandestinus)*	Sin publicar

Para los experimentos las cepas 37L, XT14, A2, A1, N3, N7, se cultivaron en medio de cultivo agar trípticasa de soya (TSA, Difco Laboratories, Detroit, EE. UU.), las cepas B02 y T88 en medio YM (g. L^{-1}): extracto de levadura: 0,5; manitol: 10,0; $MgSO_4$: 0,20; K_2HPO_4: 0,50; NaCl: 0,10; (pH 6,8) (Vincent, 1970) y para las cepas AP21 y D7 se usó el medio DYGS (g. L^{-1}): extracto de levadura: 2,0; peptona: 1,5; K_2HPO_4: 0,5; $MgSO_4*7H_20$: 0,5; ácido málico: 2,0; ácido glutámico: 1,5; glucosa: 2,0; (pH 6,8) (Döbereiner et al., 1995), a condiciones estándar: 30±2°C y 140 rpm de agitación durante 48 h.

Las suspensiones bacterianas para la inoculación de las plantas, fueron preparadas en los caldos mencionados anteriormente, incubadas durante 48 h., 30±2°C y en agitación constante de 140 rpm. Los cultivos fueron centrifugados a 10 000 *x*g por 10 minutos. Las células fueron lavadas con solución salina estéril (NaCl 0,85% pv^{-1}) y resuspendidas en la misma solución. La densidad celular fue ajustada a una densidad óptica de 600 nm (DO_{600}) de 0,2 medido en espectrofotómetro (Biotek, Synergy HTX, EE. UU), equivalente a 10^8 UFC mL^{-1} (D7, AP21, A1, N7, 37L, N3 y XT14) y 10^9 UFC mL^{-1} (A2, B02)

3.2.2 Selección de cepas mediante ensayo con plantas de ryegrass y trébol rojo en condiciones deficientes de P en el suelo.

Se desarrollaron de manera simultánea dos experimentos, uno por cada modelo vegetal en el invernadero, dentro de las instalaciones del Centro de Investigación Tibaitatá ubicado en el Kilómetro 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia. Con la finalidad de seleccionar la mejor cepa por modelo vegetal se diseñó un experimento completamente al azar con 12 tratamientos y 5 réplicas por tratamiento. Los tratamientos fueron: (1) control de fertilización de síntesis química sin inocular, (2) control de RF sin inocular, (3) RF + AP21, (4) RF+ D7, (5) RF + XT14, (6) RF + T88, (7) RF + B02, (8) RF + 37L, (9) RF + A1, (10) RF + A2, (11) RF + N3 y (12) RF + N7. En total, los experimentos tuvieron una duración de 85 días después de la siembra para el trébol rojo y 70 días para el ryegrass después del corte de homogenización, según la aparición de la tercera hoja en ryegrass (Villalobos y Sánchez, 2010) y el desarrollo foliar del trébol rojo.

El suelo empleado para el experimento fue recolectado de sistemas silvopastoriles del municipio de Obonuco, Nariño, Colombia, clasificado dentro del orden Andisol, suborden Vitric Haplustands – AMB_C según Sistema Taxonómico americano (Soil Taxonomy) (IGAC, 2004). Este suelo se caracteriza por ser de textura franca, de profundidad moderadamente a ligeramente ácida con bajos niveles de P (IGAC, 2004). Para el experimento, el suelo se tamizó y homogenizó en una malla de 50 mm y se esterilizó en dos ciclos a 121°C a 15 lb de presión por 2 h. Posteriormente se distribuyó 160 g de suelo seco en cada vaso plástico (capacidad 266 mL), el cual fue considerado una unidad experimental.

Tabla 3-2. Caracterización fisico química del suelo de sistemas silvopastoriles de Nariño

pH	M.O (%)	Cap. de intercambio catiónico (meq 100g^{-1})	Conduct. Eléct (dSm^{-1})	Elementos						
				P (mgKg^{-1})	S (mgKg^{-1})	Ca (mgkg^{-1})	K (mgkg^{-1})	Na (mgkg^{-1})	Mg (mgkg^{-1})	Fe (mgkg^{-1})
5,99 + 0,04	5,33 + 0,21	11,97 + 0,24	0,41+ 0,064	5 + 0,15	4,78+ 0,5	1.743,5+ 0,08	539,5+ 0,07	55,2+ 0,03	200,6+ 0,08	490,0 +0.08

Justo antes de la siembra, el suelo presente en cada vaso se fertilizó con: 0,152 g (equivalente a 100 mg P kg^{-1}) con RF molida (Composición en mg Kg^{-1}: 233 200 P_2O_5; 518 365,4 CaO; 108 474,8 SiO_2; 15 291,6 Al_2O_3; 3 219,2 Fe_2O_3; 3 8427,5 MgO; 5 633,7 SO_4; 2 058,6 K_2O y 101 722,2 P). La RF proviene de yacimientos de Aipe del departamento del Huila (Fosforita, Inferhuila S.A, Colombia). Los suelos fueron humedecidos previamente a la siembra con 50 mL de agua destilada estéril. En el momento de la siembra se aplicaron fertilizantes minerales solubles en solución acuosa (5 mL vaso^{-1}) a los tratamientos con las concentraciones de 31,30 mg de urea (90 mg N kg^{-1}), 25 mg cloruro de potasio (KCl; 75 mg K kg^{-1}) y solo para el tratamiento control con fertilización completa se adicionó 80 mg de fosfato diamónico (DAP; 100 mg P kg^{-1}).

Las semillas de ryegrass *(Lolium* sp var. One50*)* y trébol rojo *(Trifolium pratense* L.*)* fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5% (vv^{-1}) durante 1 minuto y alcohol (70% vv^{-1}) por 3 minutos con lavados intermedios con agua destilada estéril. Se sembraron en agar Gelified (Castanheira et al., 2014) en oscuridad con 64% de humedad relativa, 30°C±2 °C y posteriormente fueron trasplantadas después de 5 días de germinación. En el ensayo de trébol rojo se dejaron 5 plántulas por vaso y en el ensayo del ryegrass se dejaron 2 plántulas por vaso. El contenido de humedad del suelo se mantuvo al 70% de su capacidad de campo, adicionando agua destilada estéril.

La dosis de inóculo por vaso fue de 1 mL (concentración aproximada de 10^9 UFC mL^{-1}) aplicado directamente a la rizósfera según tratamiento correspondiente al momento del transplante, con reinoculación posterior al corte de homogenización de las plantas a los 45 días después de la siembra (DDS) a una altura de 8±0,5 cm del ryegrass y una altura de 1,5±0,5 cm del trébol rojo a los 60 DDS. El corte de homogenización se realizó para inducir el crecimiento uniforme en cada modelo vegetal.

Después de 25 días del corte de homogenización se realizó el muestreo destructivo y se tomó muestra de tejido foliar fresco por cada tratamiento. La variable de respuesta del experimento fue producción de biomasa seca. Este parámetro, se determinó después de someter a secado la parte aérea de las plantas de ryegrass y trébol rojo en un horno de aire caliente (Memmert, UF55, Schwabach, Alemania) a 60°C durante 72 h. En base a los resultados se seleccionó una cepa por cada modelo vegetal para su posterior caracterización *in vitro* en cuanto a su habilidad para solubilizar y mineralizar fosfato.

3.2.3 Capacidad de solubilización de roca fosfórica, fosfato tricálcico y actividad fosfatasa en medio líquido de las cepas seleccionadas.

Se evaluó la habilidad de las cepas bacterianas seleccionadas en solubilizar dos fuentes de fosfato inorgánico: Roca fosfórica (RF) y fosfato tricálcico (FTC). Cada fuente fue evaluada individualmente por triplicado a una concentración de 5 g L^{-1} en erlenmeyers con 75 mL del medio liquido NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate) (g L^{-1}): glucosa 10; $(NH_4)_2SO_4$ 0,1; KCl 0,2; $MgSO_4*7H_2O$ 0,25; $MgCl_2*6H_2O$ 5; (pH: 7.0) (Nautiyal et al., 1999). La suspensión bacteriana se inoculó al 1% vv^{-1} en cada erlenmenyer. El medio de cultivo sin inoculación se usó como control. Se llevaron a cabo monitoreos de fosfato soluble, biomasa microbiana (CFU mL^{-1}), pH y actividad fosfatasa ácida y alcalina a los 0, 1, 3, 6, 9 y 12 días después de la inoculación (DDI) (Figura 3-1).

Para la cuantificación de fosfato soluble, se tomó 1 mL del caldo del cultivo y se centrifugó a 16 000 x*g* por 10 minutos, luego, del sobrenadante se tomarón 400 µL si la fuente es RF y 50 µL del sobrenadante si la fuente es FTC. Finalmente, el contenido de P de los sobrenadantes se determinó mediante el Test de fosfatos Spectroquant® PMB (Merck®, Darmstadt, Alemania). Se leyó la absorbancia de las reacciones en espectrofotómetro (Biotek®, Synergy HTX, EE. UU) a una longitud de onda de 712 nm. Una curva patrón de P de 0,1 a 1,2 mg L^{-1} fue preparada con KH_2PO_4 (Anexo A). Adicionalmente, en los días de muestreo se determinó la población bacteriana (recuentos UFC mL^{-1}) como lo reporta Wei et al., (2016). Se midió pH, tomando una alícuota de 4 mL del cultivo en cada tiempo de medición y mediante un potenciómetro (Consort® C1010, Bélgica) se registraron los valores obtenidos por cada cepa en las dos fuentes de fosfato.

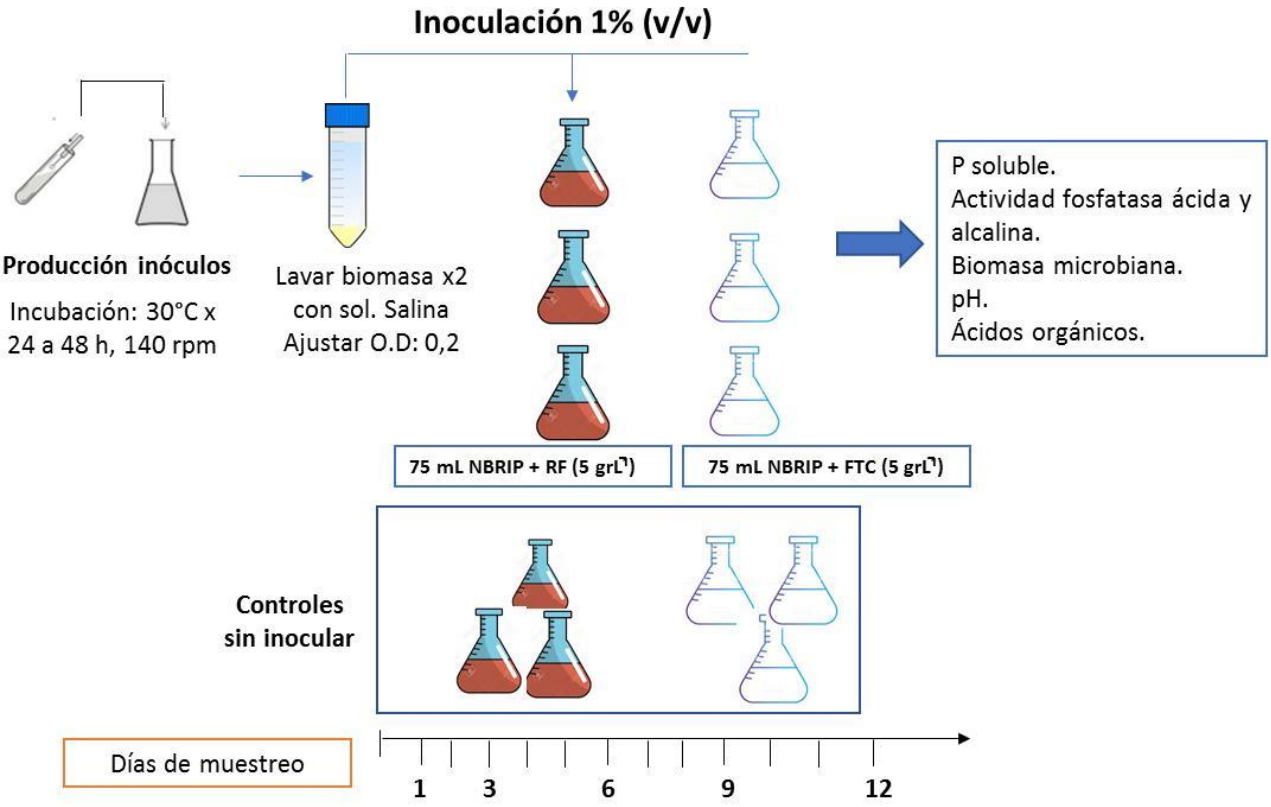


Figura 3-1. Metodología para la evaluación de solubilización de P *in vitro*

La cuantificación de la actividad fosfatasa ácida y alcalina en los tiempos evaluados fue realizada siguiendo el procedimiento reportado por De Freitas et al. (1997). A 0,1 mL del cultivo se adicionó 0,1 mL de *p*-nitrofenil fosfato (0,05M) y 0,4 mL de buffer universal modificado a un pH de 6,5 o 11,0 para la determinación de fosfatasa ácida y alcalina, respectivamente (Fernández, et al., 2012). Después de 1 h, incubado a 37°C, la reacción se detuvo adicionando 0,1 mL de $CaCl_2$ (0,5M) y 0,4 mL de NaOH (0,5M). Posteriormente se centrifugó a 14 000 x*g* por 2 minutos y la intensidad del color amarillo del *p*-nitrofenol (*p*NP) fue medido en el sobrenadante a una absorbancia de 405 nm en espectrofotómetro (Biotek®, Synergy HTX, EE. UU). La actividad fosfatasa de las bacterias fue expresada como microgramos *p*NP producido por mililitro por hora.

3.2.4 Cuantificación de ácidos orgánicos.

Conocida la cinética de solubilización de las fuentes fosfóricas evaluadas (sección 3.2.3), se identificaron y cuantificaron los AO producidos en los puntos donde mostró mayor producción

de P soluble en cada bacteria. Las cepas se inocularon en medio líquido NBRIP suplementado con RF o FTC (5 gL^{-1} cada uno) y se incubaron a 30°C con agitación constante durante 6 días para FTC y 12 días para la RF. Los días 2 y 6 fueron muestreados en el FTC y los días 2 y 12 en la RF. Se tomaron 25 mL de alícuota para cada cultivo y se filtraron a través de una membrana de celulosa con un diámetro de poro de 0,2 µm (Marciano, et al., 2019). El filtrado se almacenó en tubos de centrífuga tipo Falcón® de 50 mL de capacidad estériles y se refrigeró a 4°C para preservar la muestra.

Se usó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Agilent 1100 series, Agilent Technologies, USA), para identificar y cuantificar AO. Las muestras fueron procesadas por servicio del Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín). La metodología utilizada según descrito por Marciano, et al. (2019), fue la siguiente: las muestras previamente filtradas se inyectaron en una columna cromatográfica Supelcogel C-610H 9 µm que medía 30 cm x 7,8 mm. Los siete AO reportados en la literatura como involucrados en la solubilización se usaron como estándares analíticos, los cuales fueron los ácidos: oxálico, glucónico, malónico, láctico, fórmico, acético y propiónico. La fase móvil fue 0,1% de H_3PO_4 (pH 1,81) con un flujo de 0,8 mL min^{-1} y una inyección de 50 µL por muestra. El tiempo de adquisición de los cromatogramas se estimó en 22 minutos con intervalos de 22 minutos entre corridas. La detección se realizó por UV a 210 nm con un detector de arreglo de diodos (siglas en inglés, Diode Array Detector- DAD). Las moléculas identificadas y sus tiempos de retención típicos fueron los siguientes: ácido oxálico (4,73 minutos), ácido glucónico (7,36 minutos), ácido malónico (8,17 minutos), ácido láctico (10,31 minutos), ácido fórmico (11,22 minutos), ácido acético (12,1 minutos) y ácido propiónico (14,13 minutos). La cuantificación de los ácidos se realizó utilizando curvas de calibración de los estándares.

3.2.5 Determinación cualitativa de sideróforos y mineralización del ácido fítico.

La detección de sideróforos se realizó empleando medio sólido Cromo azurol S (CAS) preparado según lo descrito por Louden, Haarmann y Lynne (2011). Se inoculó 20 µL de la suspensión celular estandarizada a una OD_{600} = 0,2 preparadas en solución salina estéril (NaCl, 0,85% pv^{-1}) y se sembraron por triplicado a razón de tres microgotas por caja por triplicado. Luego de ser incubadas por 15 días a 30°C ± 2 la aparición de un halo de color

naranja en torno a la colonia se interpretó como producción de sideróforos positivo (Moreno, 2017).

La capacidad de producción de enzimas fitasas a cada una de las cepas seleccionadas se determinó de forma cualitativa en medio sólido NBRIP suplementado con ácido fítico sódico ($C_6H_{18}O_{24}xNa.H_2O$, Sigma-Aldrich, Alemania) como fuente de P orgánico a una concentración de 1% (pv^{-1}). El pH del medio fue ajustado a 7,0 (Leal, 2017).

Una vez ajustadas las suspensiones celulares, se inocularon 10 µL de la suspensión celular sobre la superficie del medio empleando 3 réplicas para cada cepa. Luego de 15 días de incubación a 30±2ºC, se realizaron observaciones del crecimiento de colonias y producción de halo, con el fin de estimar la eficiencia de mineralización (EM) según la metodología modificada de Kandil (2017):

$$Eficiencia\ de\ mineralización\ (EM) = \frac{Diámetro\ del\ halo}{Diámetro\ de\ la\ colonia} \times 100$$

3.2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza a un nivel de significancia de 0,05. Se emplearon dos tipos de prueba de comparación de medias: Waller-Duncan para detectar diferencias estadísticamente significativas en el ensayo de Invernadero y test de Tukey para las caracterizaciones de solubilización de P *in vitro*. Todos los análisis fueron analizados empleado el software estadístico SAS Enterprise Guide (Versión 7.1, 2014, USA).

3.3 Resultados

3.3.1 Selección de las cepas en condiciones deficientes de P.

El tratamiento de fertilización con P soluble (DAP) sin inocular, obtuvo la mayor producción de biomasa seca foliar en ambas modelos vegetales. En ryegrass presentó un valor significativo de 0,395 g $planta^{-1}$ y en trébol rojo 0,092 g $planta^{-1}$ de biomasa seca foliar *(P<0,005)*. Sin

embargo, para analizar el efecto de las inoculaciones, se compararon estadísticamente los resultados de los tratamientos inoculados frente al tratamiento control de RF sin inocular (figura 3-2 A y B).

En ryegrass, se observó que *Rhizobium* sp. T88 fue la cepa con mayor efecto promotor de crecimiento vegetal. Las plantas inoculadas con esta cepa presentaron 0,297 g planta^{-1}, lo cual representa una mejora significativa del 20,31% en comparación al tratamiento no inoculado (0,247 g planta^{-1}). Seguido de este tratamiento, se encontró *Azospirillum* sp. D7 y *Herbasprillum* sp. AP21 con 0,257 g planta^{-1} y 0,251 g planta^{-1}, respectivamente (figura 3-2 A). Todas las cepas, excepto *Rhizobium* sp. T88, no presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento no inoculado. Las cepas *Pseudomonas* sp. A1, *Stenotrophomonas* sp. A2, *Pseudomonas* sp. N3, *Beijerinckia* sp. 37L, *Rhizobium* sp. B02, *Bacillus* sp. XT14 y *Pseudomonas* sp. N7 no incrementaron la biomasa vegetal.

En relación con trébol rojo, se vió que *Herbasprillum* sp. AP21 fue la cepa con la mayor influencia sobre el crecimiento vegetal. El tratamiento sin inocular produjo 0,024 g planta^{-1}, mientras que la aplicación de *Herbasprillum* sp. AP21 generó un aumento del 44.87% (0,035 g planta^{-1}). También se observó que la cepa *Rhizobium* sp T88 aumentó la biomasa en 30,46% respecto al tratamiento no inoculado. Otras cepas que promovieron el crecimiento vegetal fueron *Bacillus* sp. XT14 y *Azospirillum* sp. D7 en 5,75% y 1,64 %, pero sin efecto significativo (figura 3-2 B). En las demás cepas se cuantificó una biomasa menor que el tratamiento no inoculado. Basado en los efectos que promovieron el crecimiento en el ryegrass perenne *(Lolium perenne L.)* con el trébol rojo (*Trifolium pratense L*.) con la adición de RF en condiciones de baja disponibilidad de P en el suelo, *Rhizobium* sp. T88 y *Herbaspirillum* sp. AP21 fueron seleccionados para evaluaciones adicionales.

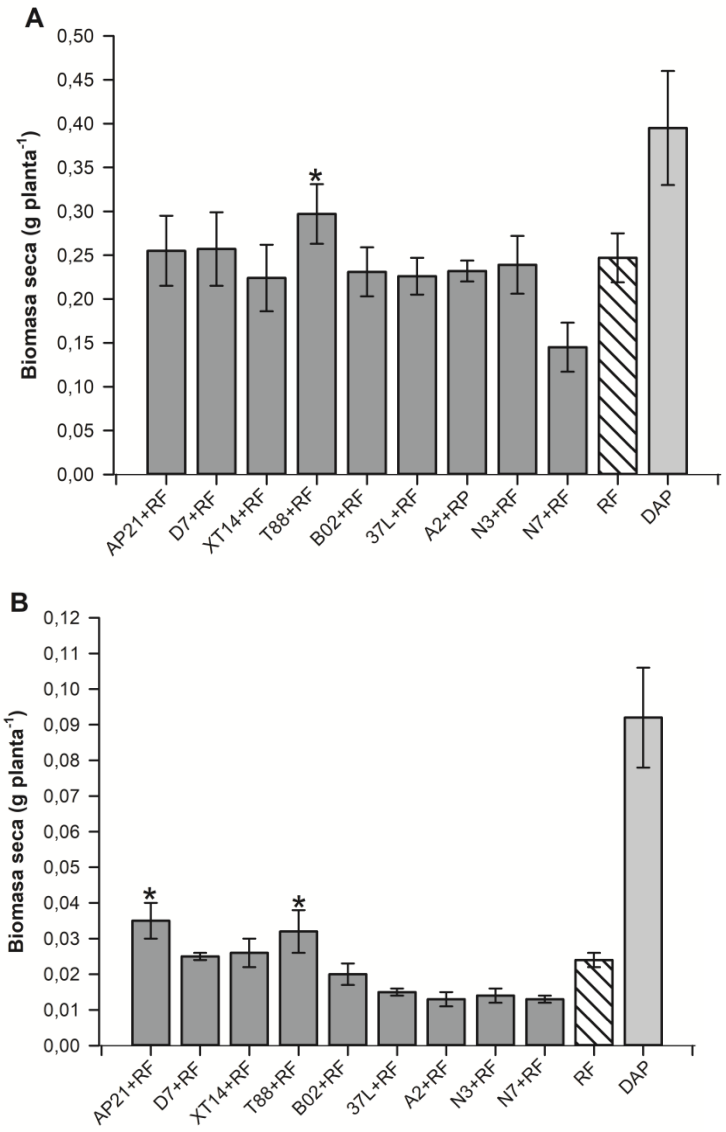
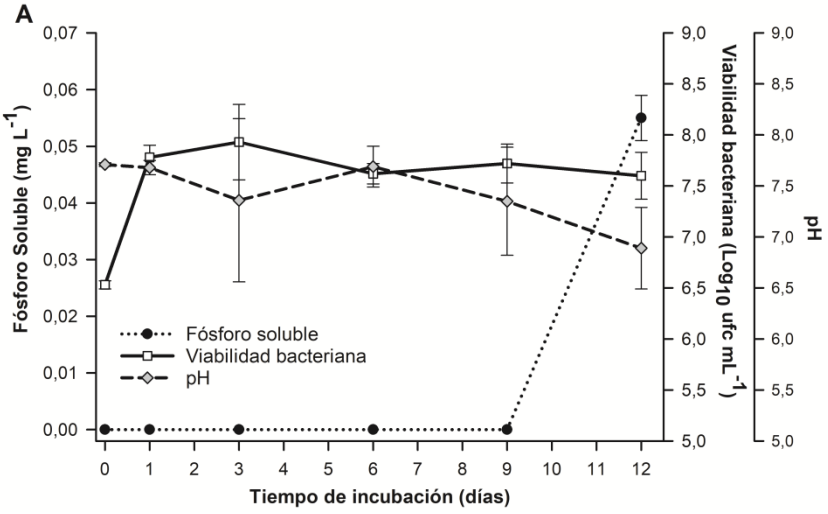
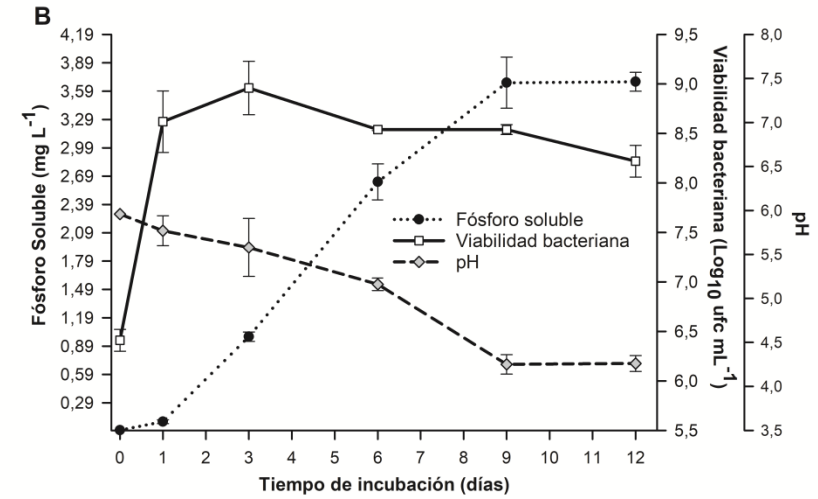


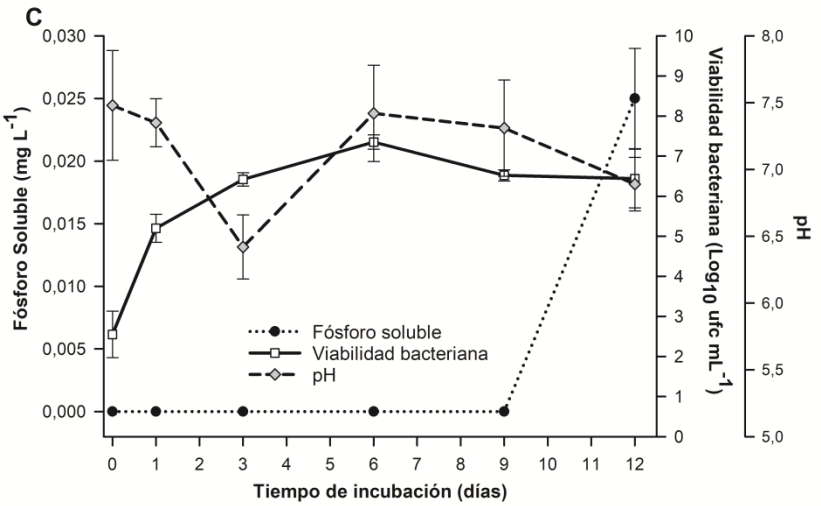
Figura 3-2. Efecto de las inoculaciones de PGPB sobre la biomasa seca foliar. A. Ryegrass perenne *(Lolium perenne* var. *One50)*. B. Trébol rojo *(Trifolium pratense)* en suelos deficientes de P. Las medias y las desviaciones estándar son el resultado de tres repeticiones por tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el tratamiento inoculado con fosfato de roca en comparación con el tratamiento no inoculado con fosfato de roca basado en la prueba de Duncan *(P<0,005)*. (RF) indica fosfato de roca.

3.3.2 Capacidad de solubilización de roca fosfórica, fosfato tricálcico y actividad fosfatasa en medio líquido de las cepas seleccionadas.

Se observó que las cepas *Herbaspirillum* sp. AP21 y *Rhizobium* sp. T88 iniciaron la solubilización de la RF hasta el día 12 después de la inoculación (DDI) *(P<0,005). Rhizobium* sp. T88 en el día 12 DDI, presentó un valor de 0,025 mg PO_4^{-3} L^{-1} con pH de 6,9. Así mismo, la cepa *Herbaspirillum* sp. AP21, al final de la evaluación (12 DDI) presentó un valor de 0,05 mg PO_4^{-3} L^{-1} con pH de 6,9. Los controles sin inocular no presentaron concentraciones de P soluble y su pH se mantuvo en 7,7. En ambos casos, se observó que mientras no se detectó P soluble en el medio, su pH se mantenía en las condiciones iniciales. Adicionalmente, la población bacteriana de la cepa *Rhizobium* sp. T88 a los 6 DDI fue de 2 x 10^7 UFC mL^{-1}, mientras que *Herbaspirillum* sp. AP21 mostró mayor crecimiento desde las 24 horas de incubación con una población bacteriana de 6,2 x 10^7 UFC mL^{-1} (figura 3-3 A, C).




B
Fósforo Soluble (mg L-1)
Viabilidad bacteriana (Log10 ufc mL-1)
pH
Fósforo soluble
Viabilidad bacteriana
pH
Tiempo de incubación (días)


C
Fósforo Soluble (mg L-1)
Viabilidad bacteriana (Log10 ufc mL-1)
pH
Fósforo soluble
Viabilidad bacteriana
pH
Tiempo de incubación (días)

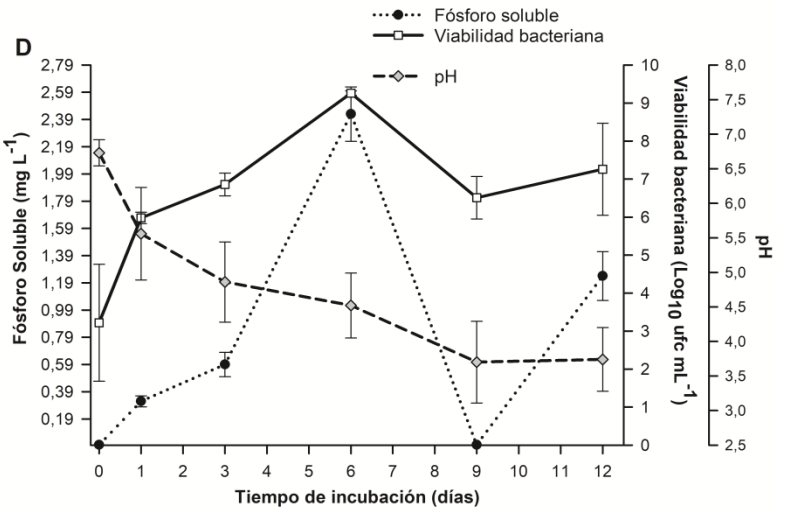

D
Fósforo soluble
Viabilidad bacteriana
pH
Fósforo Soluble (mg L-1)
Viabilidad bacteriana (Log10 ufc mL-1)
pH
Tiempo de incubación (días)

Figura 3-3. Capacidad de solubilización de fosfatos (P soluble, cambios de pH y población bacteriana) de las cepas *Herbaspirillum* sp. AP21 y *Rhizobium* sp. T88 durante 12 días en medio líquido NBRIP. A. *Herbaspirillum* sp. AP21, en roca fosfórica como fuente de P. B. *Herbaspirillum* sp. AP21, en fosfato tricálcico como fuente de P. C. *Rhizobium* sp. T88, en roca fosfórica como fuente de P. D. *Rhizobium* sp. T88, en fosfato tricálcico como fuente de P. Las medias y las desviaciones estándar son el resultado de cinco réplicas. Las barras indican la desviación estándar de cinco réplicas.

Ahora bien, la solubilización de FTC se presentó a partir de las 24 h de incubación para cada una de las cepas; *Herbaspirillum* sp. AP21, alcanzó el punto máximo a los 9 DDI con una concentración de 3,68 mg PO_4^{-3} L^{-1} con pH de 4,25, y *Rhizobium* sp. T88 en el 6 DDI alcanzó su valor máximo de 2,43 mg PO_4^{-3} L^{-1} con pH de 4,52. Además, la población bacteriana de la cepa *Herbaspirillum* sp. AP21 durante los 12 días de evaluación incrementó de 10^7 a 10^8 UFC mL^{-1}. Para la cepa *Rhizobium* sp., el crecimiento fue gradual, hasta alcanzar en el 6 DDI, una población de 1,8 x 10^9 UFC mL^{-1} y luego comenzó su descenso (figura 3- 3 B, D). Se evidenció que las cepas solubilizaron mayor cantidad de P con una caída significativa de pH a partir de esta fuente de P.

- Actividad de las enzimas fosfatasas ácida y alcalina en medio líquido.

La actividad de las enzimas fosfatasas ácida y alcalina se evidenció en ambas cepas evaluadas, observándose que su actividad estaba relacionada con la fuente de P y la acidificación del medio. En presencia de RF, la actividad de la fosfatasa alcalina fue más significativa en el 12 DDI *(P<0,005)* en ambas cepas. *Herbaspirillum* sp. AP21, presentó una actividad fosfatasa alcalina de 25,03 µg*p*NP.$mL^{-1}h^{-1}$ y *Rhizobium* sp. T88 alcanzó una actividad fosfatasa alcalina de 7,6 µg*p*NP.$mL^{-1}h^{-1}$ (Tabla 3-3).

Por otro lado, en presencia de FTC, la enzima fosfatasa ácida tuvo mayor actividad, aunque en menor concentración celular. La cepa *Rhizobium* sp. T88, presentó la mas alta actividad fosfatasa ácida *(P<0,005)* el 9 DDI (3,87 µmol*p*NP.$L^{-1}h^{-1}$), mientras que *Herbaspirillum* sp. AP21, el 3 DDI presentó la mas alta actividad fosfatasa ácida (1,18 µmol*p*NP.$L^{-1}h^{-1}$) (Tabla 3-3).

3.3.3 Producción de sideróforos y mineralización de ácido fítico

Bajo las condiciones experimentales realizadas, sólo *Herbaspirillum* sp. AP21, exhibió actividad fitasa. La actividad fitasa fue expresada en el medio NBRIP suplementado con fitato de sodio,

encontrándose una eficiencia de mineralización de 125%, indicando que el tamaño del halo fue 1,2 veces mayor que el diámetro de la colonia (tabla 3-3).

Tabla 3-3. Producción de fosfatasas, fitasas y sideróforos por las cepas de estudio

Día	Cepa	NBRIP-RF[1]		NBRIP- FTC[1]		E.M[2]	Sider[2]
		Fosfatasa alcalina µg*p*NP.mL^{-1} h^{-1}	Fosfatasa ácida µg*p*NP.mL^{-1} h^{-1}	Fosfatasa alcalina µg*p*NP.mL^{-1} h^{-1}	Fosfatasa ácida µg*p*NP.mL^{-1} h^{-1}		
1	*Herbaspirillum*	7,43 ± 1,08^{c}	0,0^{c}	0,51 ± 0,07^{a}	0,0^{c}		
3	sp AP21	12,94 ± 0,38^{b}	0,49 ± 0,07^{a}	0,00^{a}	1,18 ± 0.01^{a}		
6		9,60 ± 0,53^{bc}	0,0^{c}	0,00^{a}	0,0^{c}	125±1,6	+
9		19,66 ± 4,24^{a}	0,34 ± 0,02^{b}	0,05 ± 0,02^{a}	0,0^{c}		
12		25,03 ± 1,24^{a}	0,0 ^{c}	0,0^{a}	0,63 ± 0,12^{b}		
1	*Rhizobium* sp	3,1 ± 0,12^{c}	0,0 ^{c}	0,35 ± 0,15^{b}	2,62 ± 0,36^{b}		
3	T88	5,98 ± 0,45^{b}	0,0 ^{c}	2,93 ± 0,4^{a}	1,45 ± 0,25^{c}		
6		5,97 ± 0,6^{b}	0,0 ^{c}	0,28 ± 0,01^{b}	0,0^{d}	-	-
9		3,32 ± 0,56^{c}	17,33 ± 2,62^{a}	0,49 ± 0,07^{b}	3,88 ± 0,4^{a}		
12		7,58 ± 0,14^{a}	5,07 ± 0,61 ^{b}	0,0^{b}	0,0^{d}		

[1]: Promedios (n=3). Letras iguales no son estadísticamente diferente *(P<0,005)* según el Test de Tukey. NBRIP-RF (NBRIP +5 gL^{-1} roca fosfórica) y NBRIP-FTC (NBRIP + 5 gL^{-1} fosfato tricálcico). [2]: Promedio (n=9). E.M: Eficiencia de mineralización. Sider: Producción de sideróforos. (-) Indica la ausencia de la actividad. (+) Indica la presencia de la actividad.

Del mismo modo, *Herbaspirillum* sp. AP21 produjo halo alrededor de la colonia de color amarillo en el agar CAS, indicando ser positiva en la secreción de sideróforos (figura 3-4). *Rhizobium* sp. T88, no exhibió mineralización de fitato ni producción de sideróforos.

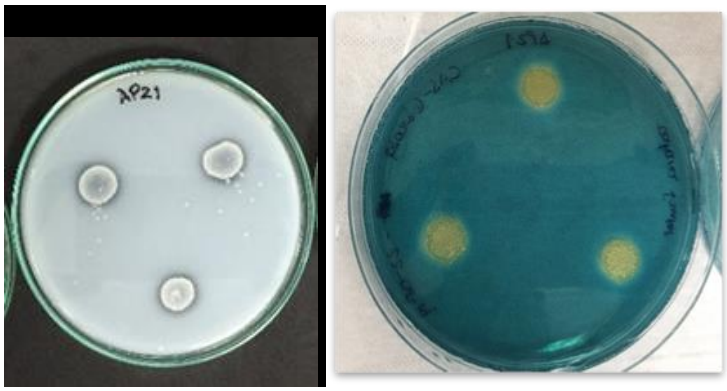


Figura 3-4. Mineralización de fitato y producción de sideróforos por *Herbaspirillum* sp. Izq: zona de halo formada alrededor de la colonia. Medio NBRIP con ácido fítico sódico ($C_6H_{18}O_{24}xNa$ y H_2O), 10 g L^{-1}. Der: Producción sideróforos en medio CAS. Ensayo de nueve réplicas.

3.3.4 Identificación y producción de ácidos orgánicos

Ambas cepas produjeron AO con las dos fuentes de P (tabla 3-4). Cinco AO, incluyendo ácido oxálico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico fueron detectados en el sobrenadante del cultivo inoculado con *Rhizobium* sp. T88 suplementado con RF a los 2 y 12 DDI. El ácido glucónico presentó la más alta concentración (1.456,2 mg L^{-1}) a los 2 DDI, seguido del ácido láctico (79,2 mg mL^{-1}). Asimismo, en la cepa *Herbaspirillum* sp. AP21, se detectaron los ácidos: oxálico, glucónico y formico a los 12 DDI, siendo el ácido glucónico el que presentó la concentración más alta a los 2 DDI en el medio (54,57 mg L^{-1}).

En cambio, solo dos AO incluyendo ácido oxálico y ácido glucónico fueron detectados en ambos sobrenadantes de *Rhizobium* sp. T88 y *Herbaspirillum* sp. AP21 en el medio de cultivo con FTC, el ácido glucónico fue el que presentó la concentración mas alta para *Herbaspirillum* sp. AP21 (119,3 mg L^{-1}) a los 6 DDI. En cambio, *Rhizobium* sp. T88 solo se detectó ácido glucónico a los 6 DDI.

Tabla 3-4. Identificación y cuantificación de ácidos orgánicos en cultivos líquidos

Cepa	Tiempo (días)	Acido Oxálico	DE	Acido Glucónico	DE	Acido Láctico	DE	Acido Acético	DE	Acido Fórmico	DE
					NBRIP – FTC (mg L^{-1})						
Herbaspirillum sp. AP21	2	1,39	0,1	53,19	11,5	-	-	-	-	-	-
	6	2,19	0,2	119,27	105.5	-	-	-	-	-	-
Rhizobium sp. T88	2	2,01	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	1,78	0,4	45,97	2,4	-	-	-	-	-	-
					NBRIP – RF (mg L^{-1})						
Herbaspirillum sp. AP21	2	5,01	0,3	54,57	1,9	-	-	-	-	-	-
	12	5,69	0,7	46,40	3,7	-	-	-	-	32,16	7,9
Rhizobium sp. T88	2	4,96	0,1	1456,18	206	79,21	3,2	34,54	4,2	-	-
	12	41,46	9,4	-	-	61,55	12,1	-	-	34,48	1,0

Promedio de tres réplicas *(n=3).* D. E: desviación estándar. (-) ausente

3.4 Discusión

3.4.1 Selección de cepas mediante ensayo con plantas de ryegrass y trébol rojo en condiciones deficientes de P.

El mantenimiento de una producción agrícola sostenible en condiciones de escasez de P, es un desafío permanente y generalmente costoso para los agricultores que cultivan en suelos

ácidos, donde la fertilización con P es necesaria. El estudio de bacterias fosfato solubilizadoras como solución biotecnológica al sector agropecuario se ha realizado desde hace varios años en diversos cultivos. Son varias las metodologías bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* (invernadero y campo) que se han reportado y que varios investigadores han encontrado diferencias y contradicciones entre estas con los resultados obtenidos (Granada et al 2018; Kishore et al 2015; Bashan et al 2013 a). Una de las principales sugerencias es llevar a cabo una selección efectiva de las bacterias fosfato solubilizadoras. Para esto, se ha recomendado evaluar el efecto promotor de crecimiento vegetal de las cepas en estudio con la planta de interés bajo condiciones nutricionales limitadas de P (Granada et al 2018). Esta sugerencia surgió porque en muchos estudios se seleccionaban bacterias fosfato solubilizadoras a partir de pruebas *in vitro* que miden la capacidad de solubilización de P sin usar la planta y sin condiciones ambientales, que influyen significativamente sobre el potencial de promoción de crecimiento (Lobo et al 2019). Collavino et al 2010 y Bashan et al 2013b sugieren que el objetivo de las pruebas *in vitro* es conocer más el metabolismo de las cepas, pero no generar una selección final para continuar con pruebas en invernadero o campo. El primer objetivo del presente estudio buscó seleccionar dos bacterias fosfato solubilizadoras que aumentaran la biomasa de ryegrass (*Lolium* var. One50) y trébol rojo (*Trifolium pratense*) bajo condiciones que promovieran las actividades metabólicas relacionadas con P, como la aplicación de una fuente insoluble (roca fosfórica) y el uso de suelo con bajo contenido de P soluble.

Los resultados permitieron inferir que hubo una respuesta diferente significativa por parte de la inoculación PGPR en el crecimiento vegetal de ambas plantas.

En general, la cepa que mayor potencial mostró para promover el crecimiento vegetal fue *Rhizobium* sp. T88, pues incrementó significativamente la biomasa seca de los dos modelos vegetales. La especificidad y efectos positivos de rizobios con leguminosas es de los temas más investigados en promoción de crecimiento vegetal, al punto que se ha encontrado que el 70% del microbioma de las raíces está constituido por bacterias del género *Rhizobium* sp. (Hartman et al. 2017). Por otro lado, también en ryegrass perenne, se han encontrado géneros específicos de *Methylobacterium* sp., *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp. y *Enterobacter* sp., enriqueciendo la rizosfera, rizoplano y endosfera de las raíces de esta gramínea (Chen et al., 2016).

Adicionalmente, *Herbaspirillum* sp. AP21 también mostró influencia benéfica, específicamente sobre el trébol rojo. Aunque *Herbaspirillum* sp., ha sido estudiada ampliamente en plantas no

leguminosas del género Poáceas (arroz, maíz, sorgo y caña de azúcar), bacterias pertenecientes a este género PGPR también se han encontrado endofíticamente asociada en nódulos de plantas dicotiledóneas como *Phaseolus vulgaris* y han ejercido influencia benéfica sobre el desarrollo vegetal (Alori et al 2017; Estrada-Bonilla et al 2013; Monteiro et al., 2012). Sorprendentemente, *Herbaspirillum* sp. AP21 promovió la biomasa del trébol rojo más que *Rhizobium* sp. T88. A pesar de que la dosis aplicada de urea (100%) a todos los tratamientos suministra teóricamente los requerimientos nutricionales del trébol rojo, supusimos que cierta cantidad de nitrógeno asimilable de la fijación simbiótica de nitrógeno con *Rhizobium* sp. T88 podría aumentar aún más la biomasa. Sin embargo, se observó pocos nódulos y la mayoría de ellos eran blancos, lo que indica que estaban inactivos. En este caso, planteamos la hipótesis de que la deficiencia de P en el suelo podría haber limitado significativamente el proceso de nodulación efectivo. Posiblemente *Rhizobium* sp. T88 aumentó el crecimiento del trébol rojo por otros mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas, donde *Herbaspirillum* sp. AP21 fue más efectivo. *Rhizobium* y *Herbaspirillum* se han destacado principalmente por supotencial en la fijación de nitrógeno (Kour et al 2019); Sin embargo, este estudio mostró su potencial como promotores del crecimiento de las plantas en condiciones limitantes de P.

En contraste, algunas cepas como *Beijerinckia* sp. 37L, *Pseudomonas* sp. N7 y *Bacillus* sp. XT14 no mejoraron la biomasa vegetal. Según Prosser et al 2007, estos efectos diferenciales podrían estar asociada a la relación evolutiva entre las diferentes especies de plantas y bacterias, y las propiedades químicas y físicas del suelo.

Se utilizó un tratamiento no inoculado con la aplicación DAP. Esto se realizó para evidenciar el efecto de la baja disponibilidad de P soluble para la planta y para determinar si el efecto de cualquier microorganismo podría generar una respuesta similar en las plantas. Con base en los resultados obtenidos, inferimos que la ausencia de P disponible afecta negativamente al trébol rojo más que al ryegrass, y que la aplicación bacteriana podría reducir la dosis de DAP. Las condiciones limitantes de P en el suelo, la adición de RF y la esterilización del suelo que permitió disminuir poblaciones microbianas nativas, permitieron observar que en los tratamientos inoculados los efectos son el resultado principalmente de la interacción de planta-microorganismo-suelo. Ya que estas condiciones son necesarias para evidenciar que las plantas respondan a un aumento de P soluble generado por la acción microbiana (Ramirez y Kloepper, 2010). Sin embargo, los resultados también permitieron observar la enorme dependencia de la fertilización con P para la producción de estos forrajes, ya que las

condiciones deficientes de P soluble, pudieron desencadenar alteraciones en el aparato fotosíntetico provocando reducción del rendimiento y desarrollo de las plantas (Hernández y Munné – Bosch, 2015).

3.4.2 Capacidad de solubilización de roca fosfórica, fosfato tricálcico, actividad fosfatasa y producción de ácidos orgánicos en medio líquido.

Para evaluar la capacidad de BSF para solubilizar P, utilizamos RF y FTC como fuentes insolubles.

Se utilizó FTC porque es una fuente 10 veces más soluble que RF (Sánchez et al., 2012). Por lo tanto, permitió comparar la dinámica de solubilización de las cepas seleccionadas en dos fuentes de P con diferentes niveles de solubilidad. Las cepas bacterianas mostraron una disminución en el pH y simultáneamente aumentaron el P soluble durante su crecimiento en el medio líquido NBRIP. En general, la disminución notable en el pH fue más prominente en el FTC que en la RF, así como en las concentraciones más altas de P. soluble. La correlación inversa entre estas dos variables ha sido señalada por otros autores como Park et al (2010) y Pereira y Castro (2014), sugiriendo que la acidificación podría facilitar la solubilización de fosfatos inorgánicos. Varios investigadores han argumentado que la condición ácida puede ser causada por dos factores: la asimilación de las fuentes de nitrógeno y la secreción de ácidos orgánicos durante el crecimiento de bacterias (Gyaneshwar et al., 2002; Scervino et al., 2010; Beltran, 2014). Según Beltrán (2014), la capacidad de solubilización de P también depende de la fuente de nitrógeno utilizada en el medio de cultivo. Se han registrado tasas de solubilización más altas en presencia de sales de amonio que cuando se usa nitrato como fuente de nitrógeno. El medio utilizado en esta prueba fue NBRIP, que está compuesto de sulfato de amonio. La asimilación de amonio genera una extrusión de protones, produciendo un pH extracelular más bajo (Gyaneshwar et al., 2002; Scervino et al., 2010). Por lo tanto, esta condición podría haber influido en la disminución del pH en las dos cepas.

En relación con los AO, su producción se produce en el periplasma de muchas bacterias gram negativas a través de la vía de oxidación directa de la glucosa (Babu-Khan et al., 1995: Zaidi et al. 2009). Los AO se difunden libremente de las células y pueden provocar la liberación de grandes cantidades de P soluble por reacciones de quelación y disociación (Sharma et al.,

2013). En el FTC, observamos que las dos cepas producen ácidos orgánicos, siendo el ácido glucónico que se encuentra en mayor concentración que el ácido oxálico. Estos ácidos han sido los más identificados en la solución de FTC y se han identificado como el principal mecanismo involucrado para su solubilización por bacterias (Bashan et al., 2013b; Estrada et al., 2013).

Otra observación que se evidenció fue la tendencia inversa entre la biomasa bacteriana y el pH. Por ejemplo, *Herbaspirillum* sp. AP21 presentó una correlación negativa *(R = -0.55)* (tabla 3-5) con la concentración de P soluble en NBRIP que contiene FTC. Rodríguez y Fraga (1999), informaron que la posible cinética de la solubilización de P por microorganismos podría estar relacionada con la diferenciación de la velocidad de liberación y absorción de P. Explican que, si la velocidad de absorción bacteriana es mayor que la de solubilización, una disminución en la concentración de P en el medio se observará. Estos resultados indicaron que *Herbaspirillum* sp. AP21, posiblemente utilizó la mayor parte del P liberado para formar parte de sus componentes celulares (Teng et al., 2019).

En el caso de la RF, se observó que ambas cepas necesitaban más tiempo (12 DDI) para llevar a cabo su solubilización que con el fosfato tricálcico. Además, las cepas sintetizaron una mayor variedad de AO con RF que el FTC. *Herbaspirillum* sp. AP21 fue capaz de producir ácido glucónico> ácido fórmico> ácido oxálico, mientras que *Rhizobium* sp. T88 produjo ácido láctico> ácido oxálico> ácido fórmico. Babana y col. (2013), mostraron que una cepa de *Pseudomonas* sp., solubilizó la RF de Tilemsi (90 mg L^{-1}) mediante la producción de ácido glucónico y oxálico. Así mismo, Do Carmo et al. (2019) mostraron que el ácido láctico, el ácido acético y el ácido propiónico producidos por *Bacillus megaterium*, *B. subtilis* y *B. licheniformis* liberaron P soluble de fluoroapatita. Las bajas cantidades de P soluble en el medio de cultivo de ambas cepas bacterianas con RF pueden estar relacionadas con su composición. La RF utilizada contiene 10,17% de P y un alto contenido de calcio (51,8%) como CaO. Se ha descrito que este tipo de RF presenta una reacción mínima en el suelo porque la liberación de P es lenta y en pequeñas cantidades en el suelo (Schwaner Shirley, 2006). En nuestro caso, la contribución de CaO podría permitir que el pH del NBRIP tienda a la neutralidad, lo que indica su alta capacidad de amortiguación, pero limita el proceso de solubilización.

Tabla 3-5. Correlaciones de Pearson entre producción de P soluble, actividad fosfatasa ácida y alcalina, pH y población en las dos fuentes de fosforo evaluadas.

Parámetro		***Herbaspirillum sp.* AP21**			***Rhizobium sp.* T88**		
	Fte. P	**P soluble**	**pH**	**Log (UFC mL^{-1})**	**P soluble**	**pH**	**Log (CFU mL^{-1})**
P soluble	FTC	1,0	-0,93**	-0,55	1,0	-0.05	0,91**
	RF	1,0	-0,45	-0,28	1,0	-0,23	0,09
Fosfatasa ácida	FTC	-0,15	0,14	0,35	-0,84**	0,08	-0,68**
	RF	-0,39	-0,13	0,04	0,04	0,21	0,18
Fosfatasa alcalina	FTC	-0,69**	0,53**	0,02	-0,25	0,25	-0,13
	RF	0,75**	-0.41	-0.03	0,67**	-0,44	0,49
Log	FTC	-0,55**	0,62**	1,0	0,91**	-0,29	1,0
(UFCm L^{-1})	RF	-0,28	0,60	1,0	0,09	-0,03	1,0

** La correlacion es significativa P=*0,001*. (-) Indica correlación negativa. P: fosforo; FTC: fosfato tricálcico; RF: roca fosfórica

En nuestro estudio, la producción de fosfatasas estuvo influenciada por parámetros como pH y concentración de P soluble en el medio. La expresión de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina en *Herbaspirillum* sp. AP21 y *Rhizobium* sp. T88 fueron detectadas en los sobrenadantes con las dos fuentes de fosfato (RF y FTC), observándose una correlación positiva y negativa acorde con la concentración de P soluble y el pH del medio (Tabla 3-5).

En presencia de RF, *Herbaspirillum* sp. AP21 y *Rhizobium* sp. T88, correlacionaron positivamente la actividad fosfatasa alcalina (r^2*=0,75* y 0,67 respectivamente), con el P solubilizado. Similares hallazgos fueron encontrados por Teng et al. (2019) y Pereira y Castro (2014), donde la actividad fosfatasa ácida se correlacionó positivamente con el P soluble liberado a partir del FTC produciendo una disminución del pH en el medio, el cual, lo relacionaron con la incidencia de la expresión de la enzima con la disminución del pH del medio. En nuestro caso, se observó mayor actividad fosfatasa alcalina en presencia de RF, probablemente debido a que el pH del medio solo se redujo hasta 6,9 al final del ensayo (12 DDI), indicando que la expresión de la enzima fue estimulada por el pH del medio, siendo cercana a la neutralidad. Aunque es poco probable que la actividad de la fosfatasa alcalina

influya directamente en la solubilización de P inorgánico, se ha descrito en procariotas el despliegue de señales para detectar agotamiento de nutrientes en la que intervienen sistemas reguladores de dos componentes (Kim y Forst, 2001), el cual puede estar involucrado en la expresión de estas enzimas bajo estas condiciones limitante de P en el medio de cultivo. Por tal razón, se ha sugerido que la síntesis de estas enzimas fosfatasa se estimula cuando el nivel de P inorgánico en el medio de crecimiento es limitante (Dick et al., 2011; De Freitas et al. 1997). Por ello, la relación aparente entre la solubilización de P y la actividad de fosfatasa es una coincidencia (De freitas et al. 1997). La fosfatasa alcalina también fue expresada en el medio ácido resultante de la solubilización del FTC por *Herbaspirillum* sp. AP21. Una correlación negativa significativa entre el P soluble y la actividad fosfatasa alcalina *(r^2=-0,69)*, fue observada, indicando que, al aumentar las concentraciones de P soluble, la actividad fosfatasa alcalina descendía, acorde al descenso del pH en el medio, el cual no favorecía su expresión.

Solo *Rhizobium* sp. T88, presentó una correlacion inversa significativa entre la actividad fostasa ácida y el P soluble (*r^2=-0,844*) a partir de FTC. Probablemente se debe a que *Rhizobium* sp., descendió el pH hasta 3,7 en la solubilización del FTC, estimulando la mayor expresión de fosfatasa ácida en el medio.

La expresión de los dos tipos de enzimas fosfatasas, fue también observada en un estudio realizado por Fernández et al., (2012), con una cepa de *Pseudomonas* sp., la expresión de la actividad fosfatasa alcalina (Rango entre 48 a 61 µg*p*NP mL^{-1} h^{-1}) y la actividad fosfatasa ácida (De 40 a 60 µg*p*NP mL^{-1} h^{-1}) fue evidente a un pH final de 4,2 a 5,8 a partir de la fuente de FTC. La expresión de la enzima fosfatasa alcalina a un pH ácido, o la enzima fosfatasa ácida en un pH alcalino también fue observada en este estudio. A partir de este comportamiento, este estudio sugiere que a pesar de que las fosfatasas se clasifican de acuerdo con su pH óptimo, su expresión está más determinada por las condiciones nutricionales del medio que activan los mecanismos metabólicos que le permitan mantener la supervivencia celular. Esto se puede relacionar con lo presentado en la población de *Rhizobium* sp. T88, lo cual, mostró una correlación positiva (*R^2= 0,91)* con el P soluble y una correlación inversa con la actividad fosfatasa ácida (*R^2 = -0,68)*, indicando que la actividad de esta enzima tuvo una relación significativa con el crecimiento de la bacteria, permitiendo deducir que los metabolitos (principalmente enzimas) de las BSF producidos durante su crecimiento, podrían estar involucrados en los procesos de adquisición de P (Zhao y Zhang, 2015).

Los resultados obtenidos en este estudio, permiten corroborar, que la solubilización de P es un proceso relacionado con el metabolismo nutricional de los microorganismos, el cual activan diversos mecanismos bioquímicos que le permitan obtener el P requerido para sus procesos fisiológicos. Por ello, las BSF para llevar a cabo la transformación de P insoluble a soluble en fosfatos y ortofosfatos, lo realizan principalmente por la secreción de AO, pero pueden poseer otros mecanismos como la producción de enzimas, quelación, intercambio de iones, entre otros factores (Da Silva et. al., 2017) para ser mas efectiva la adquisición de P requerido.

3.4.3 Producción de sideróforos y mineralización del fitato.

En cuanto a la mineralización del ácido fítico, *Herbaspirillum* sp. AP21 exhibió la capacidad de producir fitasas. En contraste, *Rhizobium* sp T88 no demostró esta capacidad. Se ha informado sobre la influencia positiva de ls cepas productoras de fitasa en el crecimiento de las plantas cuando se suministra fitato (Richardson et al., 2011; Rodriguez et al., 2006). Curiosamente, hasta el momento, no hay publicaciones sobre la actividad de fitasa en el género *Herbaspirillum*. Con respecto al *Rhizobium*, los estudios han demostrado que la síntesis de fitasa es un rasgo PGPR poco evidenciado (Hernández et al, 2015). La producción de fitasa es una actividad importante porque permite la adquisición de P a partir de formas orgánicas, que es un depósito de P en el suelo que las plantas utilizan mínimamente. En conjunto, todos estos datos indican que la solubilización y mineralización de P podrían coexistir en la misma cepa bacteriana.

Además de los mecanismos de P, otras actividades en las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas también pueden mejorar el crecimiento de las plantas al aumentar la disponibilidad de hierro y estimular la síntesis de fitohormonas. La característica PGPB relacionada con el hierro es la producción de sideróforos. Aquí, informamos que *Herbaspirillum* sp. AP21 produjo sideróforos, mientras que con *Rhizobium* sp T88 los resultados fueron negativos. Dentro del género de *Herbaspirillum*, se ha detectado la producción de sideróforos en las especies *H. seropedicae, H. canariense, H. soli* y *H. aurantiacum* (Carro et al 2011; Pedroza et al, 2011). Además de aumentar la disponibilidad de hierro, los sideróforos también tienen un efecto antagónico, lo que permite reducir las poblaciones microbianas que pueden afectar a la planta. Estos hallazgos nos llevan a considerar que una o varias de estas características podrían estar asociadas a la respuesta de la planta (Romero-Perdomo et al 2017).

Esta investigación proporciona un punto de partida para futuras investigaciones con *Rhizobium* sp. T88 y *Herbaspirillum* sp. AP21 para evaluar su potencial biofertilizante en cultivos intersiembra entre ryegrass perenne y trébol rojo. Además, estudios han demostrado la contribución específica de los mecanismos de P y otras actividades sobre parámetros nutricionales, enzimáticos y moleculares en la planta y en el suelo son necesarios llevar a cabo.

3.5 Conclusiones

La inoculación de las bacterias solubilizadoras de P generaron respuestas diferentes significativas en el crecimiento de la planta. *Rhizobium* sp. T88 y *Herbaspirillum* sp. AP21 fueron cepas que mostraron el mayor potencial para promover la biomasa seca en el ryegrass perenne *(Lolium* var. One50) y en el trébol rojo *(Trifolium pratense)* junto con la aplicación de RF en un suelo deficiente en P. Es posible que las bacterias hayan ejercido su efecto beneficioso en las plantas a través de actividades de promoción vegetal. Las dos cepas fueron capaces de solubilizar fosfato tricálcico y roca fosfórica produciendo AO y fosfatasas ácidas y alcalinas. Asimismo, *Herbaspirillum* sp. AP21 produce fitasas y sintetiza sideróforos.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las cepas del género *Rhizobium* sp. y *Herbaspirillum* sp.*,* usadas en este estudio, son promisorias para su uso como biofertilizantes en pasturas, al presentar capacidades de solubilización de los fosfatos insolubles y en el caso de *Herbaspirillum* sp mostró un potencial de mineralización del P orgánico, el cual, pueden favorecer la disponibilización del P para las plantas.

Referencias bibliográficas

Alori, ET, Glick, BR y Babalola, OO. (2017). Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. Frontiers in Microbiology. V*.8.* 971. Recuperado en: https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971

Andreote, F., Rossetto P., Mendes R., Avila L., Labate C., Pizzirani-Kleiner A., Azevedo J. y Araújo W. (2009). Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25. 1065-1073. Recuperado en: doi: 10.1007/s11274-009-9990-9.

Augustine, D.J., McNaughton, S.J., Frank, D.A. (2003). Feedbacks between soil nutrients and large herbivores in a managed savanna ecosystem. Ecol. Appl. 13 (5), 1325–1337.

Babana AH, Dicko AH, Maïga K, Traoré D. (2013). Characterization of rock phosphate-solubilizing microorganisms isolated from what *(Tricum aestivum* L.) rhizosphere in Mali. J Microbiol Microb Res 1:1‑6

Babu-Khan S, Chia Yeo T, Martin W, Duron R, Goldstein, A. (1995). Cloning a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. Applied and environmental microbiology 61(3):972-978.

Bano, N. and J. Musarrat. (2003). Isolation and characterization of phorate degrading soil bacteria of environmental and agronomic significance. Lett. Appl. Microbiol. 36: 349-353.

Barra, P.J., Viscardi, S., Jorquera, M.A., Duran, P.A., Valentine, A.J., Mora, M.L. (2018). Understanding the strategies to overcome phosphorus–deficiency and aluminum–toxicity by ryegrass endophytic and rhizosphere phosphobacteria. Frontiers in Microbiology 9, 1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01155.

Bashan Y, Kamnev AA, de Bashan LE. (2013a). A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. Biol Fertil Soils journal. 49.1–2

Bashan Y, Kamnev AA, de Bashan LE. (2013b). 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. Biol Fertil Soils journal. 49.465–479

Behera B. C. et. al. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 97–110

Beltrán P. M. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecuaria. 15 *(1*). 101-113 p. Recuperado en: https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num1_art:401

Bernal, J.E. (1998). Fertilización de pastos mejorados. En: R. Guerrero, editor, Fertilización de cultivos en clima frío. 2a ed. Monómeros Colombo Venezolanos S.A., Bogotá, Col. p. 278-328.

Bünemann, E.K., Condron, L.M. (2007). Phosphorus and sulphur cycling in terrestrial ecosystems. In: Marschner, P., Rengel, Z. (eds.), Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 65–92.

Calheiros, C.S.C., Teixeira, A., Pires, C., Franco, A.R., Duque, A.F., Crispim, L.F.C., Moura, S.C., Castro, P.M.L., (2010). Bacterial community dynamics in horizontal flow constructed wetlands with different plants for high salinity industrial wastewater polishing. Water Res. 44, 5032–5038

Carro L., Rivas R., León-Barrios M., González-Tirante M., Velazquez E. y Valverde A. (2011). *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., isolated from volcanic mountain soil, and emended description of the genus *Herbaspirillum*. International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 62. 1300-6. Recuperado en: DOI: 10.1099/ijs.0.031336-0.

Carulla J E, Cárdenas E, Sánchez N y Riveros C. (2004). Valor nutricional de los forrajes más usados en los sistemas de producción lechera especializada de la zona andina colombiana; En: Eventos y Asesorías Agropecuarias EU (ed.), Seminario Nacional de Lechería Especializada: “Bases Nutricionales y su Impacto en la Productividad”. Medellín, septiembre 1 y 2: 21 – 38.

Carulla, J., y Ortega, E. (2016). Sistemas de producción lechera en Colombia: retos y oportunidades. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, 24(2).

Castanheria N., Dourado A., Alves P., et al. (2013). Annual ryegrass-associated bacteria with potential for plant growth promotion. Microbiological research. 169. (9-10). 768-779. Portugal

Castro E., Avellaneda Y., Moreno D. C., et al. (2017) Mejoramiento de la oferta forrajera, optimización de sistemas de alimentación y aseguramiento de la calidad e inocuidad de la leche en el trópico alto del departamento de Nariño. Corpoica, Colombia.

Chen L., Brookes P. C., Xu J., Zhang J., Zhang C., Zhou X., Luo Y. (2016). Structural and functional differentiation of the root-associated bacterial microbiomes of perennial ryegrass. Soil Biology and Biochemistry. 98, 1-10 p. Recuperado en: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.04.004.

Collavino, M.M., Sansberro, P.A., Mroginski, L.A., Aguilar, O.M. (2010). Comparison of in *vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. Biol. Fertil. Soils. 26, 727–738.

Cordell, D., Drangert, J.O., White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. Glob. Environ. Chang. 19, 292–305.

Da Silva, V.N., et al. (2017). Solubility curve of rock powder inoculated with microorganisms in the production of biofertilizers, Agriculture and Natural Resources. http://dx.doi.org/10.1016/j.anres.2017.01.001

Dastager, S. G., & Damare, S. (2013). Marine actinobacteria showing phosphatesolubilizing efficiency in Chorao Island, Goa, India. Current Microbiology, 66(5), 421–427.

De Freitas, J., Baneriee, M. y Germida, J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola *(Brassica napus L.).* Biology and fertility Soils Journal. 24. 358-364. https://doi.org/10.1007/s003740050258

Dick, C. F., Dos-Santos, A. L., & Meyer-Fernandes, J. R. (2011). Inorganic phosphate as an important regulator of phosphatases. Enzyme research. Recuperado en: https://doi.org/10.4061/2011/103980

Döbereiner, J., Baldani, VLD, Baldani, JI, (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas nãoleguminosas. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, p. 66.

Do Carmo TS, Moreira FS, Cabral BV, Dantas RCC, de Resende MM, Cardoso V, Riberiro EJ. (2019). Phosphorus recovery from phosphate rocks using phosphate solubilizing bacteria. Geomicrobiol J 36:195‑203

Eraso C. Y. (2014). Influencia de la fertilidad del suelo sobre la calidad composicional de la leche y pérfiles metabólicos en animales de lechería especializada en el trópico alto de Nariño. Tesis de maestría. Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia.

Estrada, G., Divan V., De Oliveira D., Urquiaga S. y Baldani J. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. Plant Soil. 369:115–129. http://doi.10.1007/s11104-012-1550-7

Fernández L., Agaras B., Zalba P., Wall G. L. y Valverde C. (2012). *Pseudomonas* spp. isolates with high phosphate-mobilizing potential and root colonization properties from agricultural bulk soils under no-till management. Biol Fertil Soils. 48. 763‑773 p. Recuperado en: DOI 10.1007/s00374-012-0665-6

Fulkerson, W.J., J.S. Neal, C.F. Clark, A. Horadagoda, K.S. Nandra, and I. Barchia. (2007). Nutritive value of forage species grown in the warm temperate climate of Australia for dairy cows: Grasses and legumes. Livest. Sci. 107:253-264. doi:10.1016/j.livsci.2006.09.029.

Gyaneshwar P, Naresh G, Kumar L, Parekh J, Poole P. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil 245: 83–93.

Giles A. D., Hsu Pei-Chun, Richardson E. Alan, Hurst R.H., Hill Jane. (2014). Plant assimilation of phosphorus from an insoluble organic form is improved by addition of an organic anion producing *Pseudomonas* sp. Soil Biology & Biochemistry. 68. 263-269p. Recuperado en: http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.026

Granada, CE, Passaglia LM, de Souza EM, et al. (2018). Is phosphate solubilization the forgotten child of plant growth-promoting rhizobacteria?. Front Microbiol. 9:2054. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02054 PMid: 30233533

Gustafsson, J.P., Mwamila, L.B., Kergoat, K., (2012). The pH dependence of phosphate sorption and desorption in Swedish agricultural soils. Geoderma 189, 304–311.

Hartman K., Van der Jeiden M., Roussely-Provent V., Walser J. C. y Schlaeppi K. (2017). Deciphering composition and function of the root microbiome of a legume plant. Microbiome. 5:2. http://doi.10.1186/s40168-016-0220-z

Hernández I., Munné-Bosch S. (2015). Vinculación de la disponibilidad de fósforo con estrés fotooxidativo en plantas. Journal of Experimental Botany. 66. *(10)*. Pp. 2889–2900, Recuperado en: https://doi.org/10.1093/jxb/erv056

Hernandez F. I., Nápoles G. María y Morales M. B. (2015). Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya *(Glycine max* (L.) Merril) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. Cultivos Tropicales. Vol. 36, no. 1. Pp: 65-72.

Instituto Agustín Codazzi (IGAC). (2004). Estudio general de suelos y zonificación de tierras departamento de Nariño. Capítulo 3: Descripción de los suelos. 61-168. ISBN:958-9067-80.

Jones, D.L., Oburger, E. (2011). Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. In: Bünemann, E., Oberson, A., Frossard, E. (eds.), Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 169–198.

Kandil, M. M. (2017). Isolation and Characterization of Highly Effective Phytate-Mineralizing *Klebsiella pneumonia* Strain MK1C Adapted to Arid and Semiarid Conditions from Calcareous Soil PySI = HalZ d / Cln d.

Kaur G, Reddy MS. (2014). Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocational sites. European Journal of Soil Biology. 61: 35-40.

Khan, A.K., Jilani, G., Akhtar, M.S., Naqvi, S.M.S., Rasheed, M. (2009). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in cropproduction. J. Agric. Biol. Sci. 1 (1), 48–58.

Kim DJ y Forst S. (2001). Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. Microbiology. May; 147 (Pt 5): 1197-1212 p. Recuperado en: Doi: 10.1099/00221287-147-5-1197.

Kishore N., Pindi PK, Ram RS. (2015). Phosphate-solubilizing microorganisms: a critical review. In: Bahadur B. et al (eds). Plant Biology and biotechnology: volume I, plant diversity, organization, function and improvement. Springer, India. Recuperado en https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_12

Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V… & Saxena, A. K. (2019). Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 101487.

Kumawat N., Kumar R., Kumar S. and Meena V. (2017). Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture. Cap. 2: Nutrient Solubilizing Microbes (NSMs): Its Role in Sustainable Crop Production. Springer Nature. http://doi.10.1007/978-981-10-5343-6

Leal Medina, G. (2017). Selección de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) con capacidad de promoción de crecimiento vegetal, provenientes de cultivos de caña panelera con manejos agronómicos contrastantes. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Legarda Lopez, D., Benavidez Cuesta, G., & Ruiz Erazo, H. (2015). Respuesta del pasto raigrass aubade *(Lolium* sp.) a dosis de silicio en interaccion con diferentes dosis de npk. Biotecnología en el Sector Agropecuario Y Agroindustrial. 13(1), 99-109. Recuperado a partir de https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/384

Lobo, C. B., Tomás, M. S. J., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2019). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. Microbiological research, 219, 12-25.

Marciano L., Oliveira-Longatti S., Sousa S. C., Olivares F. y Souza M. F. (2019). The amount of phosphate solubilization depends on the strain, C-source, organic acids and type of phosphate. Geomicrobiology Journal. http://doi.10.1080/01490451.2018.1542469

Marra L. et. al. (2015). Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. Brazilian Journal of Microbiology. 46, *(2)*, 367-375. http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246246220131102

Mendoza Labrador J. A. y Bonilla Buitrago R. R. (2014). Infectividad y efectividad de rizobios aislados de suelos de la Costa Caribe colombiana en *Vigna unguiculata.* Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XVI No. 2. 84-89 p. http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.47246

Monteiro A. R., Balsanelli E., Wassem R., Marin A., Brusamarello-Santos L., Schmidt M., Tadra-Sfeir M., Pankievicz V., Cruz L., Chubatsu L., Pedrosa F. y Souza E. M. (2012) *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. Plant Soil. 356:175–196. http://doi.10.1007/s11104-012-1125-7

Mora, M.L., Demanet, R., Acuña, J.J., Viscardi, S., Jorquera, M., Rengel, Z., Durán, P. (2017). Aluminum-tolerant bacteria improve the plant growth and phosphorus content in ryegrass grown in a volcanic soil amended with cattle dung manure. Applied Soil. Ecology 115, 19–26. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.013

Moreno Galván A. E. (2017). Mitigación de sequía sobre *Panicum maximum* mediante consorcios bacterianos tolerantes y no tolerantes al estrés. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Moreno-Galván, A.E., Cortés-Patiño, S., Romero-Perdomo, F., Uribe-Vélez, D., Bashan, Y., Bonilla, R.R. (2020). Proline accumulation and glutathione reductase activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in *Guinea grass*. Appl. Soil Ecol. 147, 103367. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103367

Nautiyal, C.S. (1999). Anefficient microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing microorganism. FEMS Microbiology Letters 170, 265–270.

Park, J., Bolan, N., Megharaj, M., Naidu, R., (2010). Isolation of phosphate-solubilizing bacteria and characterization of their effects on lead immobilization. Pedologist 2010, 67–75

Pedrosa FO, Monteiro RA, Wassem R, Cruz LM, Ayub RA, et al. (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain *SmR1*, a specialized diazotrophic endophyte of Tropical Grasses. PLoS Genet 7(5): e1002064. doi:10.1371/journal.pgen.1002064

Percy, Ch. C. (2012). Cultivo de pastos. Manual práctico para productores. Sn Power,swisscontact. Lima, Perú. 2012. 7-16, 31-39. Recuperado en http://www.swisscontact.org/fileadmin/user_upload/COUNTRIES/Peru/Documents/Publications/MANUAL_PASTOS_CULTIVADOS.pdf.

Pereira S. y Castro P. (2014). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. Ecological Engineering journal. (73) 526-535.

Pooja, A. 2012. Molecular identification of root nodule bacteria from *Cicer arietinum.* Research Journal of Biotechnology. 7. *(1)* pp. 73-79. ISSN 2278-4535

Prosser, J., Bohannan, B., Curtis, T. et al. (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. Nat Rev Microbiol 5, 384–392. Recuperado en: https://doi.org/10.1038/nrmicro1643

Ramirez, C. y Kloepper, J. (2010). Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. Biology and Fertility of Soils. 46. 835-844. Recuperado en: 10.1007/s00374-010-0488-2.

Restrepo-Franco G. M, Moreno S., De la Fe-Pérez, et al. (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(1).63-76. http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/bacterias-solubilizadoras-de-fosfato-y-sus potencialidades-de-uso-en-la-promoci%C3%B3n-del

Richardson, A. E., and Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability. Plant Physiol. 156, 989–996. doi: 10.1104/pp.111.

Roberts, T.L., Johnston, A.E. (2015). Phosphorus use efficiency and management in agriculture. Resour. Conserv. Recycl. 105 (Part B), 275–281.

Rodríguez, H., Fraga, R., (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role inplant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17, 319–339.

Rodriguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant Soil 287:15–21

Romero-Perdomo, F.; Abril, J.; Camelo, M.; Moreno- Galván, A.; Pastrana, I.; Rojas-Tapias, D.; Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* como biofertilizante bacteriano potencialmente útil para el algodón *(Gossypium hirsutum* L.): efecto en la reducción de la fertilización nitrogenada. Rev Argent Microbiol 49: 377-383.

Scervino M, Prieto M, Ivana M, Recchi M, Sarmiento N, Godeas A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. Biol. Fertil Soils. 46:755–763

Schwaner A. Shirley. (2006). Solubilización de roca fosfórica Carolina del Norte por cepas de *Aspergillus niger Van Tieghem* y su evaluación en plántulas de lechuga *(Lactuca sativa L.)* en invernadero. Universidad austral de Chile. Valdivia-Chile

Sánchez López, D. B., Gómez-Vargas, R. M., Garrido Rubiano, M. F., & Bonilla Buitrago, R. R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. Revista mexicana de ciencias agrícolas. *3*(7), 1401-1415. Recuperado en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007093420120007000009&lng=es&tlng=es.

Sharma, S., Sayyed R., Trivedi M. and Gobi T. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach of managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springerplus Journal. 2:587. http://www.springerplus.com/content/2/1/587

Simpson, R.J., Oberson, A., Culvenor, R.A., Ryan, M.H., Veneklaas, E.J., Lambers, H., Lynch, J.P., Ryan, P.R., Delhaize, E., Smith, F.A., Smith, S.E., Harvey, P.R., Richardson, A.E., (2011). Strategies and agronomic interventions to improve the phosphorus-use efficiency of farming systems. Plant Soil 349, 89–120

Sridevi, M., Mallaiah, KV. (2009). Phosphate solubilization by *Rhizobium* strains. Indian J Microbiol. 49, 98–102 p. Recuperado en: https://doi.org/10.1007/s12088-009-0005-1

Teng Z., Shao W., Zhang K., Huoa Y., Li M. (2019). Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from heavy metal contaminated soils and their potential for lead immobilization. Journal of Environmental Management. 231. 189–197. Recuperado en: https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.012

Vargas-Martínez J.; Sierra-Alarcón, A.; Benavidez-Cruz, J.; Avellaneda-Avellaneda, Y.; Mayorga-Mogollón, O.; Ariza-Nieto, C. (2018). Establecimiento y producción de raigrás y tréboles en dos regiones del trópico alto colombiano. Agronomía Mesoamericana. 29. (1). https://doi.org/10.15517/ma.v29i1.28077

Vincent J. M. (1970). Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific publications, 164 pp. (IBP Handbook 15).

Villalobos L. y Sánchez J. (2010). Evaluación agronómica y nutricional del pasto ryegrass perenne tetraploide *(Lolium perenne)* producido en lecherías de las zonas altas de Costa Rica. I. Producción de biomasa y fenología. Agronomía Costarricense 34(1): 31-42. ISSN:0377-9424.

Wan, J. H. C. and M. H. Wong. (2004). Effects of earthworm activity and P-solubilizing bacteria on P availability in soil. J. Plant Nutr. Soil Sci. 167: 209-213.

Wei, Y., Wei, Z., Cao, Z., Zhao, Y., Zhao, X., Lu, Q., Wang, X., Zhang, X. (2016). A regulating method for the distribution of phosphorus fractions based on environmental parameters related to the key phosphate-solubilizing bacteria during composting. Bioresour. Technol. 211, 610–617.

Withers, P.J.A., Edwards, A.C., Foy, R.H. (2001). Phosphorus cycling in UK agriculture and implications for phosphorus loss from soil. Soil Use Manag. 17, 139–149.

Yadav, B., Verma, A. (2012). Phosphate solubilization and mobilization in soil through microorganisms under arid ecosystems. In: Alí, M. (ed.), The Functioning of Ecosystems. Intech, Rijeka, Croatia, pp. 93–108

Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M, Wani PA. (2009). Recent Advances in Plant Growth Promotion by Phosphate-Solubilizing Microbes. In: Khan MS et al (eds) Microbial Strategies for Crop Improvement. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 23–50

Zhao, Lei & Zhang, Y. Q. (2015). Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. Journal of Integrative Agriculture. 14. 1588-1597. 10.1016/S2095-3119(14)60966-7.

Zhu J., Li M., Whelan M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. Science of the Total Environment. 612. 522–537. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095

4. Influencia de la inoculación de BSF en la reducción de las dosis de fertilizantes fosfóricos solubles en la asociación ryegrass-trébol rojo.

Resumen

Los fertilizantes fosfatados juegan un papel importante en la nutrición vegetal de las gramíneas y leguminosas utilizadas para alimento del ganado. Diferentes fuentes de fertilizantes fosfóricos tienen alta solubilidad (fosfato diamónico-DAP) y baja solubilidad (roca fosfórica-RF). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las inoculaciones de las cepas de *Rhizobium* sp. T88 y *Herbaspirillum* sp. AP21 en forma individual y coinoculada junto a diferentes dosis de DAP (75% y 50%) complementadas con RF (25% y 50%), en una siembra asociada de ryegrass (*Lolium perenne* var. *One50)* y trébol rojo *(Trifolium pratense).* Un diseño factorial aumentado, en cuatro bloques al azar y con tres réplicas por bloque se estableció durante 115 días en condiciones de invernadero. Se plantearon diez tratamientos: (1) control positivo, 100% DAP+0%RF; (2) 75%DAP+25% RF; (3) 50%DAP+50% RF; (4) control negativo, 0%DAP+100%RF; (5) AP21+75%DAP+25%RF; (6) AP21+50%DAP+50%RF; (7) T88+75%DAP+25%RF; (8) T88+50%DAP+50%RF; (9) AP21+T88+75%DAP+25%RF; (10) AP21+T88 +50%DAP+50%RF. Se cuantifico la biomasa seca y contenido foliar de N, P, K, Ca y Mg en dos cortes realizados a las plantas; Al final del ensayo al suelo se le realizó fraccionamiento secuencial de P y la actividad de las fosfatasas ácida y alcalina fueron cuantificadas. Los efectos de las inoculaciones fueron más evidentes en el segundo corte. Nuestros resultados revelaron que *Rhizobium* sp. T88 junto a la dosis de 75% DAP, proporcionó mayor disponibilidad de P moderadamente lábil de las formas inorgánicas (368,4 mg P kg^{-1}) y mayor contenido de P foliar (2,0 g P kg^{-1}), comparado con aquellas plantas que no fueron inoculadas. Por el contrario, *Herbaspirillum* sp. AP21 proporcionó mayor mineralización del P orgánico moderadamente lábil en coinoculación al 50%DAP (264,6 mg P kg^{-1}) y expresó mayor actividad de la fosfatasa alcalina (39,8 µg *P*NPg^{-1} ss.h^{-1}). Por lo tanto, el uso de estas cepas podría ser un complemento prometedor para la fertilización fosfórica en suelos con deficiencia de P y potencialmente reducir las tasas de aplicación de fertilizantes solubles en las praderas.

Palabras claves: PGPB, fertlización fosfórica, *Rhizobium* spp.*,* *Herbaspirillum* spp.*,* fraccionamiento de P, actividad fosfatasa.

4.1 Introducción

Los esquemas de alimentación de los sistemas de lechería especializada del trópico alto colombiano están basados en el uso de forrajes (Sierra-Alarcón et al. 2019). En las praderas del trópico alto Nariñense, predominan especies de gramíneas como los ryegrass anuales o perennes *(Lolium* spp.) y de leguminosas como el trébol rojo *(Trifolum pratense)* (Muñoz, 2013). La incorporación de estas forrajeras, se debe a que son menos sensibles a bajas temperaturas y presentan un valor nutricional mayor respecto a otras gramíneas, a pesar de que el ryegrass y el trébol tienen mayores requerimientos en la calidad química y física del suelo, en los niveles de fertilización, el contenido de humedad y en el manejo del pastoreo (Bernal, 1998).

Los sistemas de producción de forrajes, generalmente presentan inadecuadas prácticas de manejo, sobre o sub pastoreo que genera compactación y degradación de suelos y uso excesivo de fertilizantes de síntesis química, lo cual resulta en una diminución en la producción de forraje (Cuesta, 2005; Black et al., 2009). Sumado a esto, los suelos del trópico alto nariñense, clasificados como andisoles, se caracterizan por su capacidad de inmovilizar el fósforo (P), presentar pH bajo y menos fertilidad, limitando la eficiencia en la producción de forrajes (Vargas-Martínez et al., 2018).

Por ello, la aplicación de fertilizantes fosfóricos para optimizar la producción de la pradera se ha convertido en una alternativa en los programas de fertilización, sin embargo, cuando se aplican en dosis elevadas se corre el riesgo de contaminar el medio ambiente (FAO, 2001). Asimismo, el 85 al 90% del P agregado al suelo no está disponible para las plantas, debido a su adsorción y precipitación por enlaces de hierro (Fe), aluminio (Al) y calcio (Ca), lo cual crea un almacenamiento de P en el suelo denominado residual (Caione et al. 2015).

De manera que, se hace imprescindible adoptar estrategias de manejo de nutrientes a los cultivos, que permitan generar sistemas de producción animal más sostenibles (Kaur y Reddy, 2015; Barra et al. 2019; Vargas-Martínez et al. 2018). La aplicación de biofertilizantes a base de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) aumentan la eficiencia de la fertilización fosfatada, por medio de mecanismos como la secreción de ácidos orgánicos o enzimas fosfatasas y fistasas (Kaur y Reddy, 2015). Las BSF transforman el P no disponible inorganico y orgánicos

en formas labiles y absorbibles por las plantas (Sharma et al. 2013; Sahandi et al. 2019). Por lo tanto, el uso de BSF en la agrícutura no solo compensaría el alto costo de los fertilizantes fosfatados de síntesis química, sino que también movilizaría P insoluble acumulado en los suelos (Chang y Yang, 2009; Banerjee et al., 2010). Es por ello, que el uso de biofertilizantes es una solucion integrada a problemas de eficiencia y reducción de fertilizantes solubles sintéticos fosfatados, además de promover el crecimiento de las plantas, mejorar la disponibilidad y absorción de nutrientes (Weller, 2007; Adesemoye et al., 2008; Singh y Reddy, 2011).

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de las inoculaciones, simple y combinada de *Herbaspirillum* sp. AP21 y *Rhizobium* sp. T88 bajo diferentes dosis de fertilización fosfórica con DAP y roca fosfórica, sobre el acumulo de biomasa seca, contenido nutricional de las plantas asociadas de reygrass y trébol rojo y la dinámica del P en el suelo.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Ensayo de invernadero

El experimento fue conducido en la Corporación Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigacion Tibaitatá, en el lote No. 5, invernadero No. 21, ubicado en el municipio de Mosquera, Cundinamarca (4°41´22,4 latitud N y 74°12´0.07 longitud Oeste). El suelo usado fue recolectado de sistemas silvopastoriles del municipio de Obonuco, Nariño, clasificado como Vitric Haplustands-AMBc, del orden Andisol (IGAC, 2004) y caracterizado física y químicamente como lo describe la tabla 3-2 (sección 3.2.2), considerándose de bajo nivel de P y materia orgánica y con altos niveles de Hierro (Fe) disponible. Se evaluaron las cepas *Rhizobium* sp. T88 y *Herbaspirillum* sp. AP21 en plantas de ryegrass perenne diploide *(Lolium* sp. *var. One50)* asociadas con trébol rojo *(Trifolium pratense)* en inoculación simple y coinoculación

El experimento fue establecido en cuatro bloques completamente aleatorizados con un diseño factorial aumentada 4x2, con tres repeticiones por bloque. El primer factor es la inoculación bacteriana, en 4 niveles (sin inocular, *Rhizobium* sp. T88, *Herbaspirillum* sp. AP21, *Rhizobium* sp. T88 + *Herbaspirillum* sp. AP21) y un segundo factor, la fertilización en dos niveles: (P, 50% = 25 mg kg^{-1} y 75% = 37,5 mg kg^{-1}) completando la dosis con roca fosfórica (RF) (Fosforita,

Inferhuila S.A, Colombia). La dosis recomendada (P, 100% = 50 mg kg^{-1}) se usó como control positivo cuando se adicionó fosfato diamónico (DAP) y el control negativo fue considerado cuando se aplicó RF exclusivamente. Los tratamientos fueron: (1) control positivo, 100% DAP +0% RF; (2) 75% DAP+25% RF; (3) 50% DAP+50% RF; (4) control negativo, 0% DAP+100% RF; (5) *Herbaspirillum* sp. AP21 + 75% DAP+25% RF; (6) *Herbaspirillum* sp. AP21 + 50% DAP+50% RF; (7) *Rhizobium* sp. T88 + 75% DAP+25% RF; (8) *Rhizobium* sp. T88 + 50% DAP+50% RF; (9) Coinoculado (*Herbaspirillum* sp. AP21 + *Rhizobium* sp. T88) + 75% DAP+25%RF; (10) Coinoculado (*Herbaspirillum* sp. AP21 + *Rhizobium* sp. T88) + 50% DAP+50%RF. Para un total de 10 tratamientos.

Las semillas de ryegrass y trébol rojo fueron desinfectadas previamente (sección 3.2.2) y sembradas asociadamente en cada matera, manteniendo una proporción de 60% poaceae y 40% de leguminosa después del crecimiento de las plántulas. Cada unidad experimental fue compuesta por una matera que contenía 3 kg de suelo seco no esterilizado. Se aplicaron dosis basales de fertilizantes a todos los tratamientos según el análisis físico químico del suelo, en solución acuosa (10 mL por matera). Las dosis empleadas fueron: N (75 mg kg^{-1}) en forma de urea y potasio (K, 75 mg kg^{-1}, calculado de acuerdo a K_2O) en forma de cloruro de potasio (KCl). Con base en estas concentraciones se aplicaron los fertilizantes (urea, 489,1 mg $maceta^{-1}$ y KCl, 468,7 mg $maceta^{-1}$) en el momento de la emergencia de la semilla. La fertilización con DAP se aplicó en solución acuosa (10 mL por matera) calculando la dosis de acuerdo con la dosis óptima (mg $matera^{-1}$: 750=100%, 563=75% y 375=50%), al tratamiento correspondiente, en el momento de la siembra. La RF de composición en mg Kg^{-1}: 233 200 P_2O_5; 518 365,4 CaO; 108 474,8 SiO_2; 15 291,6 Al_2O_3; 3 219,2 Fe_2O_3; 3 8427,5 MgO; 5 633,7 SO_4; 2 058,6 K_2O y 101 722,2 P), se aplicó en la dosis de 1429 mg $maceta^{-1}$ (P, 50 mg kg^{-1} =100%), se adicionó y homogenizó en el suelo previamente a la siembra.

Se realizaron tres cortes al forraje, iniciando con un corte de homogenización y establecimiento de las plantas a los 30 días después de la siembra (DDS) y luego dos cortes después de 40 y 45 días del corte respectivamente, simulando el pastoreo. El forraje fue cortado aproximadamente a 8±0,5 cm de altura y el contenido de biomasa seca (70°C por 72 h) fue cuantificado. El tiempo experimental fue de 115 días.

A los 20 días de germinación se inocularon 19 mL de inóculo $matera^{-1}$ (con una concentración aproximada de 10^9 UFC mL^{-1}) (Castanheira et. al., 2017) en las plantas asociadas directamente en la rizosfera y después de cada corte. Las cepas fueron producidas en medios selectivos,

siendo el medio YM (g L^{-1}): extracto de levadura: 0,5; manitol: 10,0; $MgSO_4$: 0,20; K_2HPO_4: 0,50; NaCl: 0,10; (pH 6,8) (Vincent, 1970) para la cepa *Rhizobium* sp. T88 y el el medio DYGS (g L^{-1}): extracto de levadura: 2,0; peptona: 1,5; K_2HPO_4: 0,5; $MgSO_4*7H_20$: 0,5; ácido málico: 2,0; ácido glutámico: 1,5; glucosa: 2,0; (pH 6,8) (Döbereiner et al., 1995) para la cepa *Herbaspirillum* sp. AP21, incubadas a 30°C en un shaker rotatorio (Heidolph®, Alemania) a 140 rpm por 48 h.

El material vegetal fue recolectado en el primer y segundo corte. Se cuantificaron las variables de respuesta de: biomasa seca foliar (materia seca, MS) y contenido nutricional (N, P, K, Ca y Mg) mediante análisis bromatológicos de las muestras por el método de digestión ácida con ácido nítrico, cuantificado por espectrometría de emisión por plasma. Los resultados son en base en peso seco (g kg^{-1}) (Pedraza y Pichimata, 2013).

4.2.2 Fraccionamiento de P y actividad fosfatasa ácida y alcalina en el suelo.

Al final del ensayo se recolectaron muestras compuestas de suelo de cada tratamiento por bloque. Los suelos fueron secados en un horno de aire caliente (Memmert, UF55, Germany) a 70°C por 72 h y tamizados en malla de diámetro de 1mm, para luego ser analizados.

El fraccionamiento secuencial de P fue determinado de acuerdo a Hedley et al., (1982) con modificaciones por Condron et al. (1996) representado esquemáticamente en la figura 4-1, extrayendo el fosforo inorgánico (Pi) y el fosforo orgánico (Po).

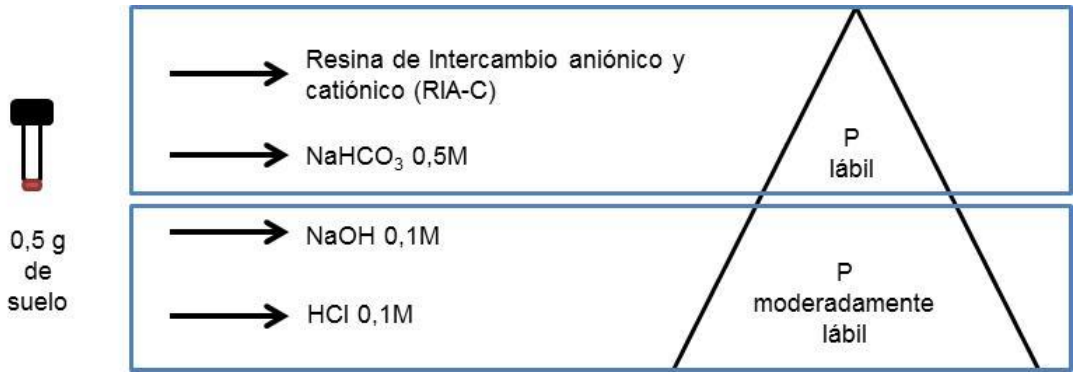


Figura 4-1. Representación esquemática del protocolo de fraccionamiento secuencial de fósforo propuesto por Hedley (1982) adaptado de Bejarano et al., 2016

En resumen, se colocaron 0,5 g de suelo en un tubo de centrífuga de 50 mL con una resina de intercambio aniónico (RIA) sumergida en 10 mL de agua desionizada con $NaHCO_3$ a 0,5 M (pH 8,5), agitándose durante 16 h a 24 ° C.

Después, la RIA se retiró del tubo y se dejó descansar en 10 mL de HCl 0,5 M durante 90 minutos y luego se agitó durante 30 minutos a 30 rpm para desorber el P de la RIA (Pi). Los tubos que contienen suelo + agua se centrifugaron a 3500 ×g durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante. El suelo residual se extrajo secuencialmente con 10 mL de $NaHCO_3$ 0,5 M (pH 8,5), NaOH 0,1 M y HCl 1 M agitando durante 16 h a 24°C. En cada fracción, los extractores de suelo se centrifugaron durante 20 minutos a 3500 x g y se analizó el sobrenadante. Los extractos se tomaron para determinaciones de Pi.

El P total (Pi+Po) se determinó a partir de las extracciones de $NaHCO_3$ y NaOH después de la digestión acidificada con persulfato de amonio ($(NH_4)_2S_2O_8$) al 7,5% p/v. El Po se estimó por la diferencia entre el P determinado en el extracto de la digestión (Pi+Po) y en el extracto directamente (Pi). El Pi de los extractores ácidos (RIA y HCl 1 M) y el P total de las digestiones se determinaron por método colorimétrico de molibdato-ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962) y el Pi de los extractores alcalinos se analizaron de acuerdo con el método propuesto por Dick y Tabatabai (1977). El P total fue calculado como la suma de las fracciones de Pi+Po.

Finalmente se determinó la actividad fosfatasa ácida y alcalina mediante el método descrito por Tabatabai y Bremmer, (1.971). Se pesó 1 g de suelo rizosferico y se le adicionó 0,2 mL de tolueno. Se incubó cada muestra a 37°C durante 1 h con 4 mL de Buffer Universal Modificado (MBU), ajustado a pH 6,5 y 11,0, para la determinación de la actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas, respectivamente; y 1 mL de una solución de *p*-nitrofenilfosfato (0,05 M) como sustrato (Tabatabai y Bremner 1969). Para evitar la dispersión de las arcillas y extraer el *p*-nitrofenol del suelo, se adicionó 1 mL de $CaCl_2$ (0,5M) y 4 mL de NaOH (0,5M), respectivamente. Las mezclas se centrifugaron a 5 000 x*g* por 10 minutos. La formación de *p*-nitrofenol (color amarillo.) en el sobrenadante fue determinada por espectrofotometría a una D.O. de 405 nm. Se realizó una curva estándar con soluciones patrones conocidas para calcular el contenido de *p*-nitrofenol (*P*NP) presente en los sobrenadantes (Anexo A). A los tubos control se le adicionó 1 mL de *p*-nitrofenil (PNP) después de las adiciones de $CaCl_2$ (0,5M) y 4 mL NaOH (0,5M) posterior a la incubación. La actividad fosfatasa fue expresada como microgramos (μg) de *p*NP producido por gramo (g) de suelo seco (ss) por hora (h) (μg *p*NP gss^{-1} h^{-1}).

4.2.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las variables de respuesta en las plantas como biomasa seca foliar, contenido de N, P, K, Ca y Mg foliar fueron analizados estadísticamente con el procedimiento de modelos lineales generales (GLM) en el software SAS Enterprise Guide (SAS Institute Inc., 2017). Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor P del análisis de varianza (ANOVA) fue inferior a 0,05 y se les realizó una comparación entre los tratamientos usando la prueba post hoc de Tukey (α=0,05)

Para analizar los efectos de las diferentes dosis de fertilización del P soluble y las inoculaciones en cuanto a la biomasa seca y contenido nutricional foliar en las plantas de ryegrass y trébol rojo asociadas, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) en cada corte, basado en la correlación de Pearson.

Las determinaciones del fraccionamiento secuencial del P y la actividad de las enzimas fosfatasas ácida y alcalina en el suelo, se examinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) realizando un análisis factorial a cada factor (dosis/inoculación) y la interacción entre los mismos. Cuando los efectos del tratamiento fueron significativos, las diferencias se compararon con la prueba de Tukey *(α = 0.05)*. También se realizó un ACP entre las variables de biomasa seca, contenido de P foliar, compartimientos de Pi y Po y actividad fosfatasa ácida y alcalina en el suelo, para discenir el efecto de la dosis de fertilización y las inoculaciones en la biodisponibilidad de P en cada tratamiento. Todos los análisis estadísticos fueron realizados por el Sistema de Análisis Estadístico - SAS Enterprise Guide v.7.1 (SAS Inc., Cary, EE. UU.).

4.3 Resultados

4.3.1 Producción de biomasa y contenido nutricional de las plantas asociadas de ryegrass y trébol rojo.

Los efectos de las inoculaciones simples y coinoculaciones en la producción de biomasa seca y contenido nutricional (N, P, K, Ca y Mg) en las plantas de ryegass y trébol rojo asociadas, bajo diferentes dosis de fertlización química con DAP (75% y 50%) en cada corte se presentan en las tablas 4-1 y 4-2.

Tabla 4-1. Influencia de la inoculación en las diferentes dosis de DAP en la producción de biomasa seca y contenido nutricional de las plantas en el primer corte*

Tratamiento	Biomasa seca foliar (g)	Caracterización nutricional (g Kg^{-1})				
		N	P	K	Ca	Mg
100% DAP + 0% RF	26,45 a	25,35 a	1,85 a	32,77	7,95	1,8 a
75% DAP + 25%RF	26,32 a	23,97 a	1,55 ab	32,57	7,30	1,57 a
50% DAP + 50% RF	23,15 ab	25,90 a	1,40 ab	31,50	6,95	1,57 a
0% DAP + 100% RF	17,77 b	26,20 a	1,27 b	32,97	7,52	1,70 a
75% DAP + 25%RF+AP21	21,87 ab	23,52 a	1,60 ab	30,10	6,97	1,65 a
50% DAP + 50% RF+AP21	22,02 ab	26,25 a	1,37 ab	28,80	7,35	1,65 a
75% DAP + 25%RF+T88	21,47 ab	26,12 a	1,35 ab	28,25	7,77	1,75 a
50% DAP + 50% RF+T88	21,87 ab	24,37 a	1,50 ab	27,52	8,05	1,75 a
75% DAP + 75%RF + Coinoculación	20,32 b	26,27 a	1,57 ab	30,45	7,87	1,77 a
50% DAP + 50% RF + Coinoculación	23,12 ab	25,52 a	1,45 b	29,82	7,27	1,72 a

*Muestras recolectadas en el primer corte de la asociación ryegrass-trébol rojo *(n=4)*. Promedios con la misma letra no diferen significativamente en el Test de Tukey con nivel de significancia de 0,05. Los elementos K y Ca no fueron significativos *(p>0,05)* en ANOVA.

Tabla 4-2. Influencia de la inoculación en las diferentes dosis de DAP en la producción de biomasa seca y contenido nutricional de las plantas en el segundo corte*

Tratamiento	Biomasa seca foliar (g)	Caracterización nutricional (g. Kg^{-1})				
		N	P	K	Ca	Mg
100% DAP + 0% RF	32,83 a	29,20 a	2,10 a	22,62	15,60 a	2,80 a
75% DAP + 25%RF	30,17 ab	25,3 ab	1,82 abc	21,15	13,3 abc	2,35 a
50% DAP + 50% RF	26,92 ab	23,45 b	1,82 abc	20,68	10,53 c	2,30 a
0% DAP + 100% RF	23,27 b	24,77 ab	1,50 c	21,40	12,15 bc	2,17 a
75% DAP + 25%RF+AP21	27,75 ab	24,25 b	1,77 abc	21,32	13,05 abc	2,25 a
50% DAP + 50% RF+AP21	25,94 ab	24,10 b	1,82 abc	21,85	13,20 abc	2,65 a
75% DAP + 25%RF+T88	27,80 ab	24,77 ab	2,00 ab	20,80	13,0 abc	2.550 a
50% DAP + 50% RF+T88	27,72 ab	25,03 ab	1,75 bc	22,17	14,3 ab	2,40 a
75% DAP + 25%RF+ Coinoculación	30,70 a	27,08 ab	1,83 abc	21,87	14,53 ab	2,30 a
50% DAP + 50% RF+ Coinoculación	26,87 ab	23,67 b	1,75 bc	21,87	12,2 bc	2,25 a

*Muestras recolectadas en el segundo corte de la asociación ryegrass-trébol rojo *(n=4)*. Promedios con la misma letra no diferen significativamente en el Test de Tukey con nivel de significancia de 0,05. El K no fue significativo *(p>0,05)* en ANOVA.

Tanto en el primer y segundo corte, las variables de crecimiento y nutrición en las plantas, no arrojaron diferencias significativas entre los tratamientos. En la producción de biomasa seca foliar en los dos cortes, el tratamiento con fertilización mineral con DAP (dosis 100%), tuvo mejor comportamiento con una producción en el segundo corte de 32,83 g de biomasa seca, a

pesar de no reflejar diferencias significativas con los demás tratamientos inoculados y sin inocular en los niveles más bajos de fertilización. En contraste, en ambos cortes, solo las plantas fertilizadas únicamente con RF sin inocular (0% DAP + 100% RF), presentaron la más baja producción de biomasa seca.

Sin embargo, para el segundo corte, en el contenido de N, P y Ca, algunos tratamientos con inoculación presentaron ligeros incrementos en sus promedios en comparación con las plantas que recibieron la misma dosis del fertilizante sin inocular hasta los 115 días de evaluación.

A pesar de que el tratamiento control positivo (100% DAP + 0%RF) mostró mayor valor en los contenidos N, P y Ca, se observó que el tratamiento con coinoculación en dosis de 75% DAP, presentó un ligero incremento en el contenido de N, en comparación al valor obtenido en la misma dosis sin inocular en los dos cortes realizados, aunque no fueron significativos (*p>0,05)*. Al igual el tratamiento de *Rhizobium* sp. T88 + 75% DAP, mostró un incremento del 10% en el contenido de P foliar, superior al tratamiento de la misma dosis sin inocular en el segundo corte.

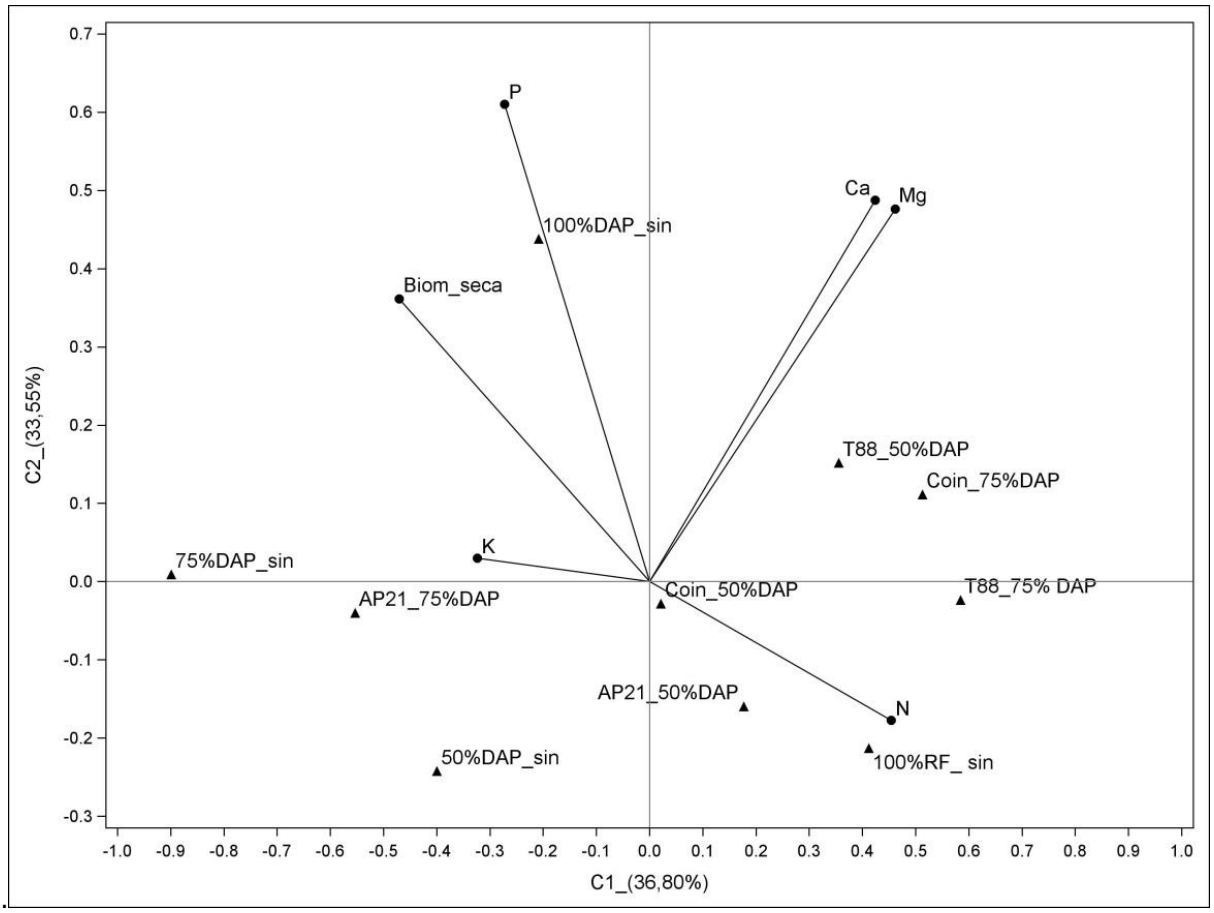
Del contenido nutricional en las plantas, el P estimado en el segundo corte, presentó el valor más alto cuando se inoculó con *Rhizobium* sp. T88 + 75% DAP, siendo superior al tratamiento de la misma dosis sin inocular, aunque fueron estadísticamente similares. Solo el contenido de Ca en las plantas del segundo corte, presentó diferencias significativas entre los tratamientos inoculados en la dosis de 50% DAP, encontrando un incremento del 35,8% de este elemento en las plantas inoculadas con *Rhizobium* sp. T88, en comparación con las plantas que recibieron solo el fertilizante en la misma dosis. En contraste, en el primer y segundo corte, las plantas que no recibieron fertilización soluble (DAP), en sustitución se aplicó RF sin inoculación (0% DAP + 100%RF) presentaron los contenidos en P, N y Ca más bajos.

En el primer corte, el ACP, mostró los componentes 1 y 2 que representaron el 70,3% de la variación total (figura 4-2a). El primer componente prinicipal (C1) explicó el 36,8% de la variación total. Este componente explicó las variables asociadas con los contenidos de Mg, N y Ca foliar y la baja producción de biomasa seca. Los tratamientos coinoculado + 50% DAP y 0% DAP + 100% RF sin inocular se agruparon en este C1 indicando ser los que presentaron menos respuesta en la producción de biomasa seca y el contenido de estos nutrientes. El componente 2 (C2) contabilizó el 33,5% de la variación total y se asoció principalmente al

contenido de P en las plantas. Solo el tratamiento control positivo, 100% DAP + 0% RF (50 mg P kg^{-1}) reflejó mayor contenido de P en el tejido vegetal en el primer corte.

En el segundo corte de las plantas, el ACP mostró mayores asociaciones en las respuestas del contenido nutricional y biomasa seca de las plantas con las dosis de fertilización y las inoculaciones (figura 4-2 b). Para el C1, se asociaron positivamente las variables correspondientes al contenido de N, Ca y biomasa seca de las plantas, representando el 66,9% de la varibilidad total. El C2 fue asociado positivamente al contenido de K foliar y negativamente al contenido de P, representando el 17,65% de la variabilidad total.

A.



B.

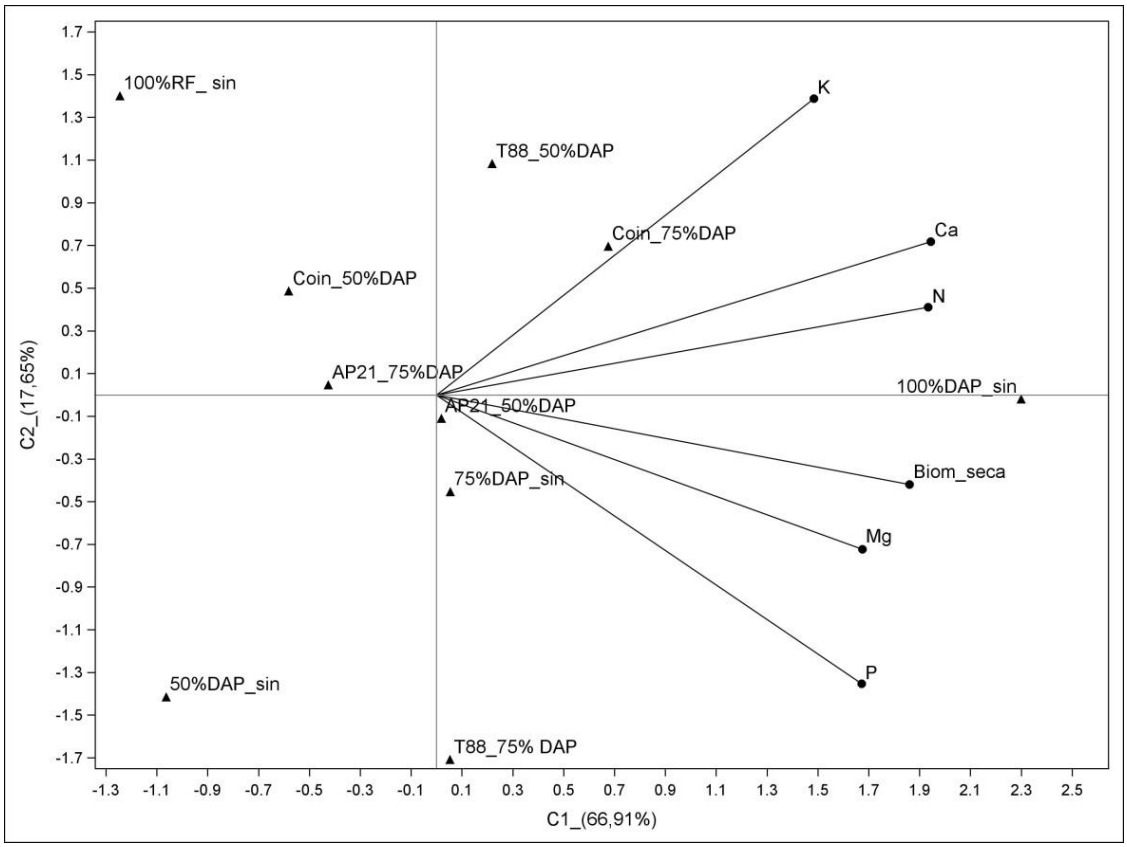


Figura 4-2. Análisis de componentes principales (ACP) entre biomasa seca y contenido nutricional (N, P, K, Ca y Mg) en la asociación ryegrass-trébol rojo. A. Primer corte. B. segundo corte. **100%DAP_sin:** dosis 100% DAP sin inocular; **75%DAP_sin**: dosis 75% DAP sin inocular; **50%DAP_sin**: dosis 50% DAP sin inocular; **100%RF_ sin**: dosis 0% DAP + 100% RF sin inocular; **AP21_75%DAP**: *Herbaspirillum* sp. AP21 + 75% DAP + 25%RF; **AP21_50%DAP**: *Herbaspirillum* sp. AP21 + 50% DAP + 50%RF; **T88_75% DAP**: *Rhizobium* sp. T88 + 75% DAP + 25%RF; **T88_50%DAP**: *Rhizobium* sp. T88 + 50% DAP + 50%RF; **Coin_75%DAP**: coinoculación + 75% DAP + 25%RF; **Coin_50%DAP**: coinoculación + 50% DAP + 50%RF; Biom_seca: Biomasa seca; N: contenido de nitrógeno; P: contenido de fósforo; K: contenido de potasio; Ca: contenido de calcio; Mg: contenido de magnesio.

El tratamiento con el 100% de la fertilización con DAP sin inoculación, presentó la mayor correlación con todas las variables. La dosis 50% DAP sin inocular y los tratamientos inoculados con *Herbaspirillum* sp. AP21 + 75%DAP y coinoculación + 50% DAP fueron trazados en el lado opuesto de las flechas de las variables medidas inidicando su baja respuesta a las evaluaciones. Al igual, las plantas no inoculadas con aplicación de RF presentaron los valores más bajos en contenido de P.

Los tratamientos correspondientes a *Rhizobium* sp. T88 + 75%DAP; *Herbaspirillum* sp. AP21 + 50% DAP y el tratamiento con aplicación de 75% DAP sin inocular se asociaciaron mejor con el contenido de P en el tejido foliar. Mientras que el tratamiento coinoculado + 75% DAP se relacionó con el contenido de N, Ca y K. Indicando las posibles tendencias de los tratamientos en esas variables hasta este momento de evaluación.

En este caso, los datos presentaron varias correlaciones significativas entre las diferentes variables de respuesta medidas en las plantas (tabla 4-3). La biomasa seca foliar arrojó altas correlaciones con los contenidos de N, P y Ca *(r^2= 0,78 y 0,71*), como también correlación entre el contenido de N con Ca y el contenido de P con Mg. Estos resultados demuestran la incidencia del contenido nutricional con la biomasa seca.

Tabla 4-3. Matriz de correlaciones de las variables del ACP del segundo corte

Parámetros	Biomasa seca foliar	N	P	K	Ca	Mg
Biomasa seca foliar	1,0	0,78**	0,78**	0,4	0,71**	0,49
N	0,78**	1,0	0,54	0,63	0,84**	0,54
P	0,78**	0,54	1,0	0,18	0,48	0,79**
K	0,4	0,63	0,18	1,0	0,76	0,44
Ca	0,71**	0,84**	0,48	0,76**	1,0	0,57
Mg	0,49	0,54	0,79**	0,44	0,57	1,0

Los valores son promedios de *(n=4)*. ** Correlación es significativa.

4.3.2 Fraccionamiento de P y actividad fostasa ácida y alcalina en el suelo.

El Pi de la fracción lábil extraído por la resina de intercambio aniónico (Pi_{RIA}) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Sin embargo, el Pi unido al Ca/Mg, determinado en la extracción con bicarbonato de sodio (Pi_{BIC}), presentó solo efecto significativo en la dosis de fertilizante *(p<0,02)*, indicando que a mayores dosis de DAP se incrementa la fracción del P lábil en el suelo. Solo el tratamiento inoculado con *Rhizobium* sp. T88 + 50%

DAP, mostró incremento no significativo estadísticamente de 14,1% de Pi lábil (Pi_{BIC}) en relación al tratamiento con 50% DAP sin inocular.

En cuanto la fracción orgánica lábil, (Po_{BIC}), fue significativamente afectada por la interacción dosis x BSF (inoculación) (tabla 4-4) encontrándose que la inoculación con *Herbaspirillum* sp. AP21 + 75%DAP aumentó significativamente respecto a los demás tratamientos el P disponible para las plantas, con un valor promedio de 74 mg kg^{-1}. La fracción moderadamente lábil de P, referente al P absorbido por el Fe en el suelo, obtuvo mayores valores en la forma inorgánica ($Pi_{NaOH-0,1}$) que en el P ligado a ácidos húmicos y fúlvicos presentes en la forma orgánica ($Po_{NaOH-0.1}$) (tabla 4-4).

Tabla 4-4. Fraccionamiento de fósforo en suelos fertilizados con diferentes dosis de fosfato diamónico (DAP) y roca fosfórica (RF) con inoculaciones simples y combinadas de bacterias solubilizadoras de P (BSF)

Tratamientos	P lábil			P Moderadamente lábil			UP alcalina	UP ácida
	Pi_{RIA}	Pi_{BIC}	Po_{BIC}	$Pi_{NaOH-0.1}$	$Po_{NaOH-0.1}$	Pi_{HCl}		
		--Ca/Mg--		--Fe/Al--		--Ca--		
	----------mg Kg^{-1}----------						- (µg *P*NPg^{-1} ss.h^{-1})-	
Dosis[1]								
75%DAP+25% RF	17,89	23,05 a	58,69	274,16	164,47	48,29 b	31,88 b	78,61
50%DAP+50% RF	16,45	20,50 b	50,58	231,97	212,94	56,66 a	37,82 a	74,13
Inoculación								
Sin inocular	16,60	22,14	46,44	242,44	198,36	48,73	36,34 a	78,18
Herbaspirillum sp AP21	17,18	21,80	63,14	242,59	183,64	53,88	39,54 a	74,02
Rhizobium sp T88	18,51	22,96	54,59	303,48	141,21	54,88	27,71 b	76,03
Coinoculadas	16,38	20,21	54,37	223,76	231,62	52,42	35,83 a	77,26
Dosis x Inoculación								
Sin inocular + 75%DAP+25%RF	16,69	23,49	48,84 b	240,65 b	212,82 ab	47,94	34,32	76,82
Sin inocular + 50%DAP+50%RF	16,51	20,79	44,04 b	244,24 b	183,89 b	49,53	38,36	79,54
Herbaspirillum sp AP21 + 75%DAP+25%RF	19,18	23,97	74,01 a	245,44 b	171,29 b	53,88	37,43	92,26
Herbaspirillum sp AP21+ 50%DAP+50%RF	15,18	19,64	52,27 b	239,75 b	195,98 b	53,88	41,65	55,77
Rhizobium sp T88+75%DAP+25% RF	18,64	22,52	53,97 b	368,41 a	75,10 c	47,52	23,90	71,26
Rhizobium sp T88+50%DAP+50% RF	18,38	23,39	55,2 b	238,55 b	207,32 b	62,24	31,51	80,80
Coinoculadas + 75%DAP+25% RF	17,05	22,23	57,93 b	242,14 b	198,65 b	43,84	31,88	74,11
Coinoculadas + 50%DAP+50% RF	15,71	18,19	50,81 b	205,38 b	264,58 a	61,0	39,77	80,40
					Valor *p*			
Valor p_{Dosis}	0,063	<0,02	<0,002	<0,0001	<0,0001	<0,01	<0,001	0,477
Valor p_{BSF}	0,198	0,269	<0,001	<0,0001	<0,0001	0,47	<0,002	0,968
Valor $p_{Dosis*BSF}$	0,251	0,24	<0,02	<0,0001	<0,0001	0,10	0,719	0,052

Análisis factorial por ANOVA de las muestras obtenidas en cada tratamiento (*n=4).* [1]Dosis de fertilización en las fuentes de DAP es fosfato diámonico y RF es roca fosfórica. Pi RIA es P extraído por resina de intercambio aniónico; Pi BIC y Po BIC son los P unidos al Ca/Mg, extraídos por una solución de bicarbonato de sodio; Pi NaOH y Po NaOH es el P unido al hierro/aluminio extraído por una solución de hidróxido de sodio 0,1N; Pi HCl es el fosforo unido al calcio y extraído por una solución de ácido clorhídrico 1M. UP: Unidad fosfatasa. Las medias fueron comparadas por el Test de Tukey (*p<0.05).* **Los tratamientos control fueron excluidos del análisis

Lo anterior puede estar relacionado con la alta concentración de Fe que presentó el suelo según análisis físico-quimico (tabla 3-2). Se observó diferencia significativa entre la interacción dosis x BSF *(p<0,01)* tanto en las formas inorgánica y orgánica de esta fracción. Sólo el tratamiento inoculado con *Rhizobium* sp. T88 + 75%DAP presentó un aumento significativo del P inorgánico en esta fracción ($Pi_{NaOH-0,1}$ = 368,41 mg kg^{-1}). En contraste, el mismo tratamiento presentó el valor mas bajo en esta fracción a partir del P orgánico ($Po_{NaOH-0.1}$ = 75,1 mg kg^{-1}). Las concentraciones de $Po_{NaOH-0,1}$ en la fracción moderadamente lábil, mostró los contenidos más altos (264,58 mg Kg^{-1}) cuando se inocularon las dos cepas (*Rhizobium* sp. T88 y *Herbaspirillum* sp. AP21) en presencia del 50% DAP, siendo más significativo que los demás tratamientos.

Finalmente, la fracción HCl 0,1 M, que corresponde también al Pi moderamente lábil unido al calcio (Ca), solo presentó efecto signifcativo en dosis de fertilizante *(p<0,01)* presentando en la dosis de 50%DAP + 50%RF el promedio mas alto con 56,7 mg Kg^{-1}. El tratamiento donde se aplicó solo RF fue similar con 56,22 mg Kg^{-1} (datos mostrados anexo B). La aplicación de RF aumentó el Pi_{HCl} debido a la presencia de fosfatos de calcio en la RF. El tratamiento que recibió solo DAP (100%) presentó una concentración más baja en esta fracción (46,7 mg Kg^{-1}) (Anexo B).

Se encontró en este estudio que la actividad fosfatasa ácida fue mayor que la actividad fosfatasa alcalina, aunque no presentó diferencias significativas *(p>0,05)*. Sin embargo, cuando se inoculó con *Herbaspirillum* sp. AP21 en dosis de 75% DAP, presentó mayor actividad fosfatasa ácida (92,3 µg *P*NP g^{-1} ss.h^{-1}), superior a los tratamientos restantes (anexo C).

Por otro lado, la actividad fosfatasa alcalina presentó diferencia significativa en la dosis del fertilizante y la inoculación con las BSF *(p<0,001)*. La expresión de esta enzima fue mayor cuando la dosis correspondía a 50%DAP + 50%RF. En las inoculaciones solo fue diferente la actividad fosfatasa alcalina cuando se inoculó con *Rhizobium* sp. T88, presentando la menor actividad en el suelo (27,7 µg *P*NP g^{-1} ss. h^{-1}) probablemente debido a la presencia de mayores cantidades de Pi soluble en el suelo proporcionado por este tratamiento (Tabla 4-4). Las demás inoculaciones se comportaron estadísticamente similar con los tratamientos no inoculados *(p<0,05)*.

Un ACP fue usado para determinar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la dinámica de las fracciones de P en el suelo, actividad de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina, biomasa

seca foliar y contenido de P en las plantas de ryegrass y trébol rojo (figura 4-3). La variación de los datos se representó en dos componentes principales. Los primeros dos componentes explicaron el 69,5% de la varianza total. El primer factor que explicó el 50% de la variabilidad de los datos, estaba compuesto principalmente por la adquisición del P disponible en el suelo, asociando las variables del contenido de P foliar y el P lábil en forma inorgánica (Pi_{RIA} y Pi_{BIC}) en el suelo. El segundo factor, está compuesto principalmente por la actividad fosfatasa ácida y la fracción lábil de Po (Po_{BIC}) del suelo que representaron el 19,7% de la varianza de los datos.

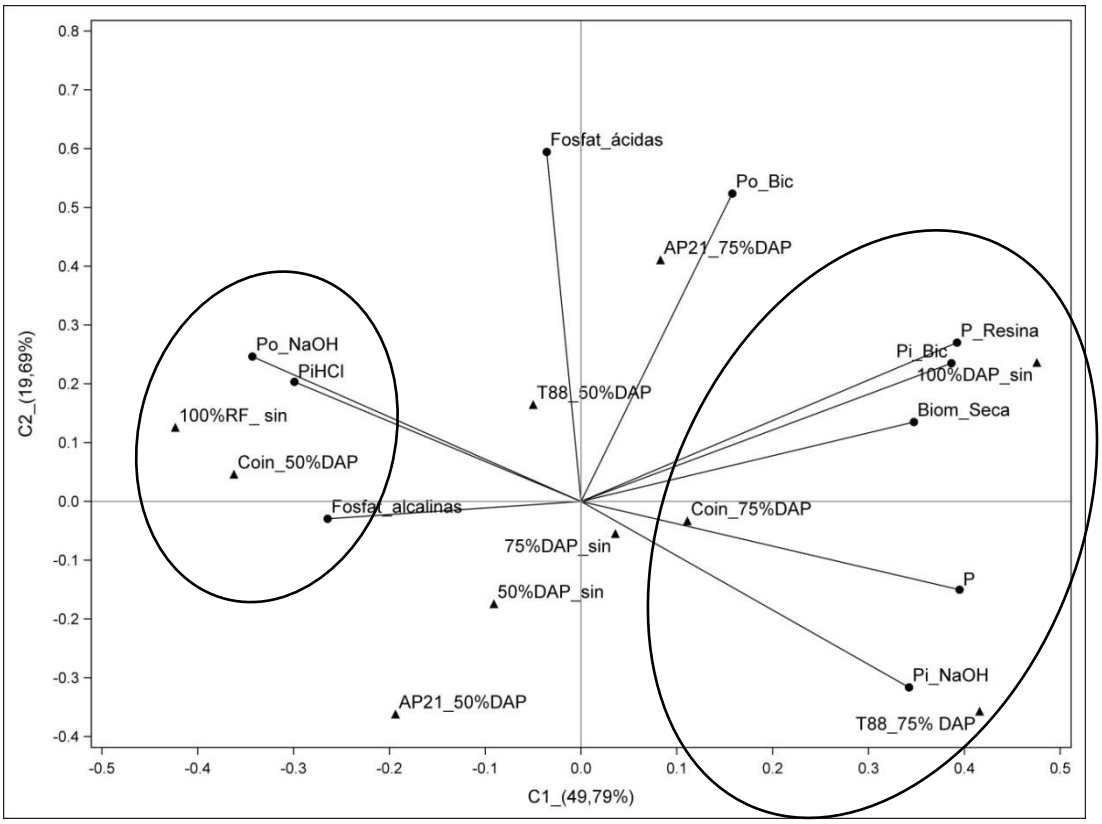


Figura 4-3. Análisis de componentes principales de biomasa seca foliar, contenido de P foliar y los distintos compartimientos de P y actividad fosfatasa en el suelo, en los diferentes niveles de DAP e inoculación de cada tratamiento. Los círculos negros son agrupaciones según las correlaciones de Pearson encontradas. **100%DAP_sin:** dosis 100% DAP sin inocular; **75%DAP_sin**: dosis 75% DAP sin inocular; **50%DAP_sin**: dosis 50% DAP sin inocular; **100%RF_ sin**: dosis 0% DAP + 100% RF sin inocular; **AP21_75%DAP**: *Herbaspirillum* sp. AP21 + 75% DAP + 25%RF; **AP21_50%DAP**: *Herbaspirillum* sp. AP21 + 50% DAP + 50%RF; **T88_75% DAP**: *Rhizobium* sp. T88 + 75% DAP + 25%RF; **T88_50%DAP**: *Rhizobium* sp. T88 + 50% DAP + 50%RF; **Coin_75%DAP**: coinoculación + 75%

DAP + 25%RF; **Coin_50%DAP**: coinoculación + 50% DAP + 50%RF; **Biom_seca:** Biomasa seca; **N**: contenido de nitrógeno; **P**: contenido de fósforo; **K**: contenido de potasio; **Ca:** contenido de calcio; **Mg**: contenido de magnesio; **fosfat_ácida**: actividad fosfatasa ácida; **fosfat_alcalina**: actividad fosfatasa ácida; **Pi_Resina**: resina; **BiPi**: Pi extraído por bicarbonato; **BoPo**: Po extraído por bicarbonato; **NaOH_Pi**: Pi extraído por NaOH; **NaOHPo**: PO extraído por NaOH.

Las dos agrupaciones resaltadas en la figura 4-3, presentan correlaciones significativas entre las variables analizadas. En la primera agrupación, correspondiente al C1, se correlaciona positivamente el contenido de P foliar y biomasa seca con la fracción de P lábil en la forma de P inorgánico (r^2 = *0,72 y 0,83* respectivamente). Estas variables presentaron mayor efecto en el tratamiento donde se aplicó el fertilizante soluble (DAP) en la dosis de 100% DAP junto al tratamiento inoculado con *Rhizobium* sp. T88 en la dosis de 75% DAP. Para estos tratamientos, el contenido de Pi cuantificado en las fracciones de resina y bicarbonato, fue mayor, incidiendo en la mayor producción de biomasa seca.

La segunda agrupación, asoció las variables correspondientes al P moderamente lábil, determinado en las fracciones de $Po_{NaOH\text{-}0,1}$ y Pi_{HCl} y la actividad fosfatasa alcalina. Los tratamientos donde solo se aplico RF sin inocular y el coinoculado con la dosis de 50% de DAP fueron los más relacionados con el P moderadamente disponible. La presencia de la RF en proporción más alta, influyó en el incremento del P unido al Ca reflejado en la fracción Pi_{HCl}. Su lenta solubilización estimula la actividad fosfatasa como respuesta a los bajos niveles de P disponible en el suelo. La actividad fosfatasa alcalina tuvo correlación positiva con la fracción $Po_{NaOH\text{-}0,1}$ (r^2*=0,56)* y se correlacionó negativamente con la fracción $Pi_{NaOH\text{-}0,1}$ (r^2 *=-0,60),* ya que su actividad esta dada por la mineralización de la materia orgánica presente en el suelo. El suelo utilizado contenía 5,3% de materia orgánica (tabla sección 3.2) considerado nivel medio para los requerimientos de los cultivos de forraje en una pradera (ICA, 1992; Sierra-Alarcón et al. 2019).

4.4 Discusión

4.4.1 Efecto de las inoculaciones y las diferentes dosis de los fertilizantes minerales en la dinámica del P en el suelo y su incidencia sobre la biomasa seca y contenido nutricional en las plantas de ryegrass-trébol rojo.

Nuestros resultados permitieron observar que durante el tiempo de evaluación de la asociación ryegrass–trébol rojo en materas, bajo condiciones de invernadero, no se evidenciaron diferencias significativas en las variables de respuesta medidas en las plantas (producción de biomasa seca y contenido nutrional: N, P, K, Ca y Mg) entre los tratamientos no inoculados e inoculados en los niveles de fertilización fosfórica (50% y 75% de DAP).

El tiempo de evaluación del experimento, hasta 115 días, quizás no fue suficiente para encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, en cuanto al desarrollo y promoción vegetal de las plantas. Probablemente, porque en este tiempo áun son plantas jóvenes en etapa vegetativa donde presentaban mayor proporción de hojas y tallos con buen valor nutritivo, el cual, va reduciendose al aumentar la edad y alcanzar el estado de madurez (Cuesta, 2005). Tal como se evidencia en los resultados, el contenido nutricional se incrementó en el segundo corte, lo cual demuestra que las plantas aún no habían alcanzado la madurez donde empiezan a declinar su composición nutricional. También, se sugiere que la competencia interespecífica de la asociación entre la gramínea y leguminosa en la matera, pudieron estar influyendo en la absorción de los nutrientes por las raíces del suelo y en la producción de biomasa seca. Por lo tanto, es común observar en estudios que la producción de biomasa seca en consorcios o asociaciones de plantas no presentan diferencias significativas en diferentes niveles de fertilización fosfatada o nitrogenada (Vargas et al, 2018; Sierra-Alarcón et al, 2019; Tambara et al, 2017; Vendramini et al., 2014; Steinwandter et al, 2009). Acorde a lo anterior, se sugiere que las concentraciones bajas de P del suelo empleado (tabla 2-2), junto a las dosis reducidas de P soluble en las dosis del fertilizante del estudio, probablemente generó una limitación de P en el suelo, el cual no permitió una respuesta en ambas plantas a los niveles creciente de P aplicado, promoviendo ligeramente pequeños incrementos en la producción de biomasa seca de las plantas asociadas, al aumentar la fertilización.

Sin embargo, se permite resaltar que los resultados obtenidos en el segundo corte, presentaron ligeros incrementos en la producción de biomasa seca y concentración de nutrientes, que, aunque no significativos en algunos tratamientos, mostraron una tendencia al efecto del tratamiento. Esta tendencia fue más notoria, en los tratamientos con la fertilización completa (100% DAP) en producción de biomasa seca y en los tratamientos inoculados con *Rhizobium* sp. T88 y en coinoculación, ambos, junto a la dosis de 75% DAP, presentaron mayor incidencia en el contenido de P y Ca en las plantas como se reflejó en el ACP (figura 4-2). Solo el contenido de Ca foliar en la mezcla de los forrajes, si evidenció un efecto significativo en las plantas inoculadas con *Rhizobium* sp. T88, en dosis de 50% de DAP + 50% RF, en relación al tratamiento de la misma dosis sin inocular, sugiriendo que quizás la mayor absorción de Ca, esté relacionada con la presencia de la RF en el suelo. Este aporte del P, a partir de fosfatos naturales no reactivos, como la RF, tienen gran cantidad de fosfato de calcio estable (apatita), que se solubiliza y se hace mas aprovechable en la extracción debido a la acidificación del medio (Caione et al. 2015). Por ende, la RF no solo es fuente de P sino además de Ca, favoreciendo el mayor contenido de este nutriente cuando se aplicó la mayor dosis de RF junto con la inoculación. Además, los resultados obtenidos en el fraccionamiento secuencial de P en el suelo, mostraron en la fracción extraída con HCl, que a mayor dosis de aplicación de RF, proporcionó un aumento en la concentración de fosfatos de calcio en el suelo. Por lo tanto, la RF puede estar contribuyendo adicionalmente al aporte de Ca, influyendo en la disponiblidad de este nutriente en el suelo durante el proceso de solubilización del fosfato realizado por las BSF. Además, el aporte de P de las RF en el suelo, es gradual en el tiempo, debido a su lenta liberación. Por ello, cuando se aplicó la RF sin inocular proporcionó a las plantas menor rendimiento en biomasa seca y menor calidad nutricional que el resto de las plantas tratadas. Asi mismo, se ha sugerido que posiblemente la combinación de diferentes cepas de BSF, podrían tener un “efecto sinérgico” entre ellos, mayor exploración de las fuentes limitadas de P en el suelo, mediante mecanismos de interacción sinérgica que quedan por explorar (Yu et. al., 2012) y que requieren más estudios para su validación.

La aplicación de las dosis de fertilizante DAP junto con RF, con o sin la adición de las BSF, mostraron diferentes respuestas en los compartimientos de P (lábiles y moderadamente lábiles) en el suelo tanto en las formas orgánicas e inorgánicas. Se evidenció que los incrementos en la concentración del P inorgánico lábil, estuvo relacionado con la dosis del fertilizante DAP, indicando mayor proporción de P disponible en el suelo, cuando se aplicó DAP en las dosis

más alta. Estos incrementos en las fracciones de Pi lábil extraídas con resina y bicarbonato de sodio, también fueron halladas por Pavinato et al. (2009) y Rodrigues et al. (2015). Estas fracciones lábiles del P inorgánico, representan el P mas biodisponible para la nutrición y desarrollo de las plantas (Giovannini, 2013). Por lo tanto, las plantas fertilizadas con las dosis mas altas de DAP (100% y 75%) presentaron mejor respuesta en biomasa seca y nutrición, debido a su aporte de P más fácilmente aprovechable para la absorción por las raíces en el suelo. Incluso, entre las dosis de DAP del 100% y 75%, se comportaron estadísticamente similares en las variables de respuesta de las plantas, pertimiendo plantear que la dosis adecuada para estos forrajes podría ser reducida en un 25% del fertilizante soluble, representando una disminución en los costos de fertilización fosfatada.

En cuanto al P orgánico lábil (Po_{BIC}) del suelo, se pudo observar, que la inoculación con *Herbaspirillum* sp. AP21, incrementó significativamente esta fracción, cuando se aplicó la dosis de 75% de DAP, en comparación cuando no se inoculó. Este aumento puede atribuirse, a la presencia de formas orgánicas de mayor disponibilidad que por posterior mineralización ejercida por los microorganismos se transformaría en Pi-HCO_3 (Giovannini, 2013), ocurrido principalmente por la actividad de enzimas fosfatasas que contribuyen al aumento del P disponible en el suelo a partir de los compuestos orgánicos (Spohn et. al., 2015). De tal forma, esta cepa, expresó mayor actividad fosfatasa alcalina (AFac) y mayor concentración de P en la fracción Po_{BIC} que los demás tratamientos, correlacionándose positivamente ($r^2 = 0,48$) ambas variables. Entonces posiblemente esta enzima fosfatasa catalizó la hidrólisis del P orgánico, liberando ortofosfato y, en consecuencia, aumentó la disponibilidad de P lábil en el suelo.

La fracción de P moderamente lábil extraída con NaOH 0,1M, presentó diferencias significativas en la interacción dosis x BSF a partir de las formas inorgánicas y orgánicas. A pesar que entre los tratamientos no presentó incrementos significativos en la cuantificación del P inorgánico unido a iones de hierro o aluminio, sorprendentemente el tratamiento inoculado con *Rhizobium* sp. T88 en dosis de 75% DAP, presentó un aumento del Pi de esta fracción. Probablemente, este aumento puede estar asociado con el tipo de suelo utilizado y su capacidad de sorción. En este caso, se utilizó un Andisol, el cual, en estos suelos, el P puede ser fuertemente adsorbido por los minerales del suelo (por ejemplo, alofano) y/o precipitado por iones libres de hierro y aluminio en la solución del suelo (Osorio et al, 2015), limitando su disponibilidad. Por consiguiente, se sugiere hipotéticamente, que posiblemente los iones de P liberados ya sea por la solubilización de la RF aplicada o la mineralización del P orgánico del

suelo, ejercida por los microorganismos, pueden estar siendo adsorbidos por estos compuestos, permitiendo el aumento de esta fracción. Este hecho puede ser relacionado con la disminución de la fracción moderadamente lábil orgánica ($Po_{NaOH-0,1}$), sugiriendo la posible mineralización del P orgánico mediada por *Rhizobium* sp. T88 en el suelo. Aunque esta cepa de rizobio no presentó características de expresión de fitasas en condiciones *in vitro*, si expresó actividad fosfatasa ácida y alcalina, el cual también están relacionadas con la mineralización de compuestos fosfóricos orgánicos.

De igual forma, se observó el potencial que puede tener la cepa *Rhizobium* sp. T88 en la conversión de compuestos de P insolubles en formas solubles principalmente por procesos de acidificación y producción de ácidos orgánicos, que fueron observados en los ensayos *in vitro* de solubilización de RF y FTC (sección 3.3.2). Por lo tanto estas cualidades exhibidas pueden estar relacionadas también en este caso. La liberación de ácidos orgánicos, la quelación de metales a partir de formas de P adsorbidas a metales poco solubles (por ejemplo, Fe–P y Al–P) son algunos de los mecanismos realizados por los microorganismos en el suelo mas referenciados (Richardson et al., 2009; Adesemoye et al., 2009; Kishore et al., 2015).

En la forma orgánica moderadamente lábil ($Po_{NaOH-0,1}$), que constituye compuestos orgánicos altamente complejos asociados con minerales arcillosos y acidos fúlvicos y húmicos (Foltrand et al., 2019), la inoculación con *Rhizobium* sp. T88 en la dosis de 75% DAP + 25% RF, presentó una disminución significativa de esta fracción. Esta disminución puede estar relacionada con la mineralización de la materia orgánica en esta fracción, el cual favoreció la mayor obtención de P para las plantas. Entonces probablemente, las plantas sometidas a este tratamiento, lograron tomar el P del suelo, principalmente por la mineralización ejercida de estas formas orgánicas moderadamente lábiles. Esta alta mineralización encontrada, puede ser una estrategia potencial para disponibilizar el P orgánico presente en el suelo, ya que según lo reportado por Cherubin et al., (2016) el P disponible en las plantas en pasturas depende en gran medida de la mineralización, debido al reciclaje de P, donde hasta el 85% del P absorbido por las plantas (Nash et al, 2014) se devuelve al suelo por la descomposición de las raíces resultante del pastoreo, asociándose con una mayor actividad biológica del suelo (Lavelle et al., 2014; Franco, 2015).

Otro rasgo analizado en este estudio, fue la actividad fosfatasa ácida y alcalina en el suelo de cada tratamiento. Se encontró valores más altos en la actividad fosfatasa ácida, aunque no

presentó diferencias significativas *(p<0,05)* entre los tratamientos. La mayor actividad fosfatasa ácida respecto a la alcalina, puede estar fuertemente relacionada con la contribución de las raíces de las plantas y de la flora microbiana presente en esta zona, la cual pudo estar estimulada cuando el P era más limitado (Juma y Tabatabai 1988). Por ello, la mayor producción de esta enzima se observó cuando la dosis del fertilizante soluble se reducía a la mitad (50%) (Tabla 4-3). Aunque en este estudio, no se pudo diferenciar entre las fosfatasas producidas por la raíz y las cepas bacterianas, algunas evidencias realizadas en otros estudios sugieren que las fosfatasas de origen microbiano poseen mayor afinidad por los compuestos de Po que las derivadas de las raíces de las plantas (Yadav y Tarafdar, 2001).

Por otro lado, la actividad fosfatasa alcalina mostró diferencias significativas en la dosis del fertilizante soluble, mostrando que la reducción de la aplicación del fertilizante soluble en 50%, esimulaba la expresión de esta enzima en el suelo. Además, la inoculación presentó efectos significativos en la actividad fosfatasa alcalina. La inoculación con *Herbaspirillum* sp AP21, expresó mayor actividad fosfatasa alcalina aunque se comportó estadísticamente igual al tratamiento sin inocular. Probablemente el microbioma de la rizosfera de ryegrass y trébol rojo, pudieron ejercer influencia en la activida fosfatasa alcalina, ya que las condiciones del suelo no eran estériles. *Herbaspirillum* sp AP21, ha mostrado una capacidad potencial en la mineralización del P orgánico, al exhibir presuntivamente la producción de enzimas fitasas en condiciones *in vitro* (sección 3.3.4). Esta cualidad, junto con la actividad fostatasa, permitiría aumentar su habilidad en la adquisición de P a partir de compuestos orgánicos presentes en el suelo, el cual favorecería el aprovechamiento de este déposito de P poco adsequible para las plantas. Por otro lado, la inoculación con *Rhizobium* sp. T88, expresó menor actividad fosfatasa alcalina. Aunque se sugiere que probablemente esta cepa, también ejerció solubilización del Pi simutáneamente a la mineralización del Po, como mecanismos de obtención del P requerido para su metabolismo y supervivencia microbiana en el suelo. Por lo que posiblemente, estos incrementos en las concentraciones de ortofosfato en el suelo, puedan estar inhibiendo la actividad fosfatasa, tal como lo ha señalado Jones y Burguer (2011).

Finalmente, se pudo evidenciar que la disponibilidad de P se ve afectada por una serie de reacciones abióticas y bióticas en el suelo, que influyen en la relación del P soluble y el P insoluble (DeLuca et al., 2009). Por ello, el papel de los microorganismos en la disponibilidad de nutrientes en el suelo, es importante, como se propone en este estudio, porque ellos intervienen en procesos como la desorción y solubilización de Pi rápidamente intercambiable y

en la liberación de Pi de la fase sólida del suelo o del fertilizante (fracción lábil o moderadamente lábil), como también en la mineralización del P de residuos de plantas, fertilizantes orgánicos y de la materia orgánica, (Frossard et al., 2011), el cual, es inducida por la exudación de fosfatasas ácidas y alcalinas de raíces y/o microorganismos.

4.5 Conclusiones

Nuestro estudio permitió deducir que en la asociación ryegrass-trébol rojo, una dosis adecuada de aplicación de fosfato diamónico (DAP) puede ser al 75% de la dosis convencional, ya que se obtiene una producción de biomasa seca y un contenido nutricional similar a la dosis completa. De igual manera, en esta dosis del fertilizante soluble (75%), se mostró una tendencia de mayor efecto de los inoculantes de *Rhizobium* sp. y *Herbaspirillum* sp., en forma simple o coinoculada en cuanto a las concentraciones de P, N y Ca en las plantas.

La cepa *Rhizobium* sp. T88 mostró mayor potencial en la conversión de compuestos de P insolubles en formas solubles, porque suministró mayor contenido de P disponible en las fracciones lábiles del suelo, lo cual, puede favorecer la mayor absorción de P para la planta. De igual manera, la cepa *Herbaspirillum* sp. AP21, mostró un potencial de solubilización de fosfatos inorgánicos, pero a su vez, presentó mayor eficiencia en la mineralización enzimática en el suelo, al incrementar la disponibilidad del P proveniente de formas orgánicas moderadamente lábiles, correlacionándose positivamente con la actividad fosfatasa ácida y alcalina cuando se redujo a 50% la aplicación de DAP.

Por lo tanto, ambas cepas inoculadas de manera simple o combinada pueden representar una alternativa en la eficiencia del P orgánico e inorgánico presente en el suelo, el cual podría generar un impacto en la reducción de los fertilizantes fosfóricos sintéticos en una pradera. Sin embargo, es necesario validar las dosis mínimas del fertilizante fosfórico junto con las inoculaciones en condiciones reales de campo con mayor número de cortes sucesivos hasta la fase de producción de los forrajes en la pradera, para evidenciar el efecto de las inoculaciones en el rendimiento y calidad nutricional de las forrajeras que permitan garantizar la dosis óptima de eficiencia del fertilizante en la mejor toma de nutrientes por las raíces de las plantas.

Referencias bibliográficas

Adesemoye, A. O., Torbert, H. A. y Kloepper, J. W. (2008). Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. Can. J. Microbiol. 54: 876–886.

Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C. and Standing, D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. Aust. J. Crop Sci. 4: 378–383

Barra P. P., Delgado M., Parra-Almuna L., Duran P., Valentine A., Jorqura M. A. y Mora M. L. (2019). Phosphobacteria inoculation enhances the benefit of P–fertilization on *Lolium perenne* in soils contrasting in P–availability. Soil Biology and Biochemistry. 136. 107516. Recuperado del 12 de junio de 2019 de: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.06.012

Bejarano H. W., Rodrigues M., Bettoni T. A., Barth G., y Pavinato S. (2016). Crop Yields and Soil Phosphorus Lability under Soluble and Humic-Complexed Phosphate Fertilizers. Agronomy Journal. 108:1692–1702

Bernal, J.E. (1998). Fertilización de pastos mejorados. En: R. Guerrero, editor, Fertilización de cultivos en clima frío. 2a ed. Monómeros Colombo Venezolanos S.A., Bogotá, Col. p. 278-328.

Black, A.D., A.S. Laidlaw, D.J. Moot, and P. O´Kiely. (2009). Comparative growth and management of white and red clovers. Irish J. Agr. Food Res. 48:149-166

Castanheria N. L., Dourado A. C., Pais I., Semedo J., Scotti-Campos P., Borges N., Carvalho G., Barreto C. M. y Fareleira P. (2017). Colonization and beneficial effects on annual ryegrass by mixed inoculation with plant growth promoting bacteria. Microbiological Research 198. 47 – 55. Recuperado del 9 de enero del 2017 de: http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.009.

Caione G., De Mello P. R., Silva C. C., Rodrigues M., Pavinato P. S. y Bastos A. F. (2015). Phosphorus Fractionation in Soil Cultivated with Sugarcane Fertilized by Filter Cake and Phosphate sources. Communications in Soil Science and Plant Analysis. http://doi.10.1080/00103624.2015.1081926

Chang, C. H. y Yang, S. S. (2009). Thermo-tolerant phosphate solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. Bioresource Technol. 100: 1648–1658.

Cherubin R, M., Franco A., Cerri C., Karlen D., Pavinato P., Rodrigues M. (2016). Phosphorus pools responses to land-use change for sugarcane expansión in weathered Brazilian soils. Geoderma 265. 27–38. Recuperado de 17 de noviembre del 2015 de: http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.

Condron, L.M., Cornforth, I.S., Davis, M.R., Newman, R.H., (1996). Influence of conifers on the forms of phosphorus in selected New Zealand grassland soils. Biol. Fertil. Soils 21, 37–42

Condron, L. M. y Newman, Susan. (2011). Revisiting the fundamentals of phosphorus fractionation of sediments and soils. J Soils Sediments. V: 11. 830-840 p. Recuperado en: DOI 10.1007/s11368-011-0363-2

Cuesta, P.A. (2005). Fundamentos de manejo de praderas para mejorar la productividad de la ganadería del trópico colombiano. Rev. Corpoica. 6 (2): 5-13. http://doi.10.21930/rcta.vol6_num2_art:42.

DeLuca, T.H., Gundale, M.J., MacKenzie, M.D., (2009). Biochar effects on soil nutrient transformations. In: Lehmann, J., Joseph, Stephen (*eds*.), Biochar for Environmental Management: Science and Technology. Earthscan, London, UK, pp. 251–270.

Dick WA, Tabatabai MA. (1977). Determination of orthophosphate in aqueous solutions containing labile organic and inorganic phosphorus compounds. J Environ Qual 6:82–85

Döbereiner, J., Baldani, VLD, Baldani, JI, (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas nãoleguminosas. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, p. 66.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). *Los fertilizantes y su uso*. (2001). Cuarta edición. Roma. Recuperado el 12 de agosto de 2013 de: http://ftp.fao.org/agl/agll/docs/fertuso.pdf

Foltran C. E., Tertulino R. J. H., Bazani J. H., De Moraes G. J., Rodrigues M., Pavinato P., Ribas V. G., Erro J., Garcia-Mina J. M. (2019). Phosphorus pool responses under different P inorganic fertilizers for a eucalyptus plantation in a loamy Oxisol. Forest Ecology and Management. V: 435. 170-179 p. Recuperado en: https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.10.053.

Franco, A.L.C., (2015). Soil engineering by macroinvertebrates: controls on soil organic matter storage across land use change. Thesis (PhD in Soil Science and Plant Nutrition) Luiz de Queiroz" College of Agriculture, University of São Paulo 72p.

Frossard, E., Achat, D.L., Bernasconi, S.M., Bünemann, E.K., Fardeau, J.C., Jansa, J., Morel, C., Rabeharisoa, L., Randriamanantsoa, L., Sinaj, S., Tamburini, F., Oberson, A., (2011). The use of tracers to investigate phosphate cycling in soil-plant systems. In: Bünemann, E., Oberson, A., Frossard, E. (e*ds.*), Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 59–91.

Giovannini J. M. (2013). Estudio cuantitativo del efecto de bacterias solubilizadoras de fósforo sobre las distintas fracciones de este elemento en el suelo. Universidad Nacional de la Pampa. Santa Rosa, Argentina.

Hedley, M.J., Stewart, J.W.B. and Chauhan, B.S., (1982). Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions by cultivation practices and by laboratory incubations. Soil Sci. Soc. Am. J., 46: 970-976.

ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). (1992). Fertilización en diversos cultivos. Quinta aproximación. Manual de asistencia técnica No. 25. ICA, Colombia.

Instituto Agustín Codazzi (IGAC). (2004). Estudio general de suelos y zonificación de tierras departamento de Nariño. Capítulo 3: Descripción de los suelos. 61-168. ISBN:958-9067-80.

Jones, D.L., Oburger, E. (2011). Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. In: Bünemann, E., Oberson, A., Frossard, E. *(eds.)*, Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 169–198.

Juma NG, Tabatabai MA (1988). Hydrolysis of organic phosphates by corn and soybean roots. Plant Soil 107:31–38

Kaur, G. y Reddy, M. S. (2015). Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. Pedosphere. 25(3): 428–437.

Lavelle, P., Rodríguez, N., Arguello, O., Bernal, J., Botero, C., Chaparro, P., Gómez, Y., Gutiérrez, A., Hurtado, M.P., Loaiza, S., Pullido, S.X., Rodríguez, E., Sanabria, C., Velásquez, E., Fonte, S.J., (2014). Soil ecosystem services and land use in the rapidly changing Orinoco River Basin of Colombia. Agric. Ecosyst. Environ. 185, 106–117.

Masson-Boivin, C. et al. (2009) Establishing nitrogen-fixing sym-biosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends Microbiol. 17, 458–466

Muñoz M. E. (2015). Planificación forrajera de fincas lecheras pertenecientes al circulo de excelencia II de Fedegan, como herramienta para el mejoramiento de la competitividad ganadera del departamento de Nariño. Universidad de Nariño. Pasto, Nariño.

Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal Chim Acta 27:31–36

Nash, D.M., Haygarth, P.M., Turner, B.L., Condron, L.M., McDowell, R.W., Richardson, A.E., Watkins, M., Heaven, M.W. (2014). Using organic phosphorus to sustain pasture productivity: a perspective. Geoderma 221, 11–19.

Pavinato, P.S., Merlin, A., Rosolem, C.A., (2009). Phosphorus fractions in Brazilian Cerrado soils as affected by tillage. Soil Tillage Res. 105, 149–155.

Pedraza R. y Pichimata M. A. (2013). Diagnóstico de fertilidad de suelos y de disponibilidad y calidad de forraje del municipio de Monterrey, departamento de Casanare, Colombia. CORPOICA. 31p. ISBN: 978-958-740-175-2

Richardson A. E., Hocking P. J., Simpson R. J. and George T. S. (2009). Plant mechanisms to optimise access to soil phosphorus. Crop & Pasture Science, 60, 124–143. https://doi.org/10.1071/CP07125

Rodrigues, M., Pavinato, P.S., Withers, P.J.A., Teles, A.P.B., Herrera, W.F.B. (2015). Legacy phosphorus and no tillage agriculture in tropical Oxisols of the Brazilian savanna. Sci. Total, Environ. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.118 In press.

Sahandi S. M., Mehrafarin A., Badi N., Khalighi-Sigaroodi F., Sharifi M. (2019). Improving growth, phytochemical, and antioxidant characteristics of peppermint by phosphate-solubilizing bacteria along with reducing phosphorus fertilizer use. Industrial, crops and products. V: 141. Recuperado en: https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111777.

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A., (2013). Phosphate Solubilizing Microbes: Sustainable Approach for Managing Phosphorus Deficiency in Agricultural Soils. 2. SpringerPlus, p. 587.

Sierra-Alarcón A., Moreno-Oviedo Y., Mancipe-Muñoz E. A., Avellaneda-Avellaneda Y., Vargas-Martínez J. de J. (2019). Efecto de la fertilización nitrogenada y fosfatada en raigrases perennes y tréboles rojos. Agronomía mesoamericana. 30. (3): 841-854. e-ISSN 2215-3608. http://doi.10.15517/am.v30i3.35170

Singh, H. and Reddy, S. M. (2011). Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. Eur. J. Soil Biol. 47: 30–34.

Sprent, J.I., (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. New Phytol. 174, 11‐25.

Spohn M., Treichel N. S., Cormann M., Schloter M. y Fischer D. (2015). Distribution of phosphatase activity and various bacterial phyla in the rhizosphere of *Hordeum vulgare L.* depending on P availability. Soil Biology & Biochemistry 89. 44e51. http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.018

Steinwandter, E., Olivo, CJ, Santos, JC, Araújo, TLDR, Aguirre, PF y Diehl, MS. (2009). Produção de forragem em pastagens consorciadas con diferentes leguminosas sob pastejo rotacionado. Acta Scientiarum. Ciencias animales, 31 (2), 131-137.

Tabatabai, M. A.; Bremner. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology & Biochemistry 1: 301-307.

Tambara, A. A. C., Sippert, M. R., Jauris, G. C., Flores, J. L. C., Henz, Éderson L., y Velho, J. P. (2017). Production and chemical composition of grasses and legumes cultivated in pure form, mixed or in consortium. Acta Scientiarum. Animal Sciences, 39 (3), 235-241. https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v39i3.34661

Vargas-Martínez J.; Sierra-Alarcón, A.; Benavidez-Cruz, J.; Avellaneda-Avellaneda, Y.; Mayorga-Mogollón, O.; Ariza-Nieto, C. (2018). Establecimiento y producción de raigrás y tréboles en dos regiones del trópico alto colombiano. Agronomía Mesoamericana, 29, (1). http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43754020015. https://doi.org/10.15517/ma.v29i1.28077

Vendramini, JMB, Dubeux, JCB Jr. y Cooke, RF. (2014). Gramíneas e Leguminosas de Clima Temperado. En RA Reis, TF Bernardes y GR Siqueira. Forragicultura: Ciência, Tecnologia e Gestão dos Recursos Forrageiros (p. 176-196). Viçosa, MG: UFV

Vincent J. M. (1970). Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific publications, 164 pp. (IBP Handbook 15).

Weller, D. M. (2007). Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. Phytopathology. 97:250–256

Yadav, .R., Tarafdar.J. (2001). Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. Biol Fertil Soils, 34. 140–143 p. Recuperado en: https://doi.org/10.1007/s003740100376

Yu, X., Liu X., Zhu T., Liu G., Mao C.. (2012). Co-inoculation with phosphate-solubilzing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. European Journal of Soil Biology 50. 112-117.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Entre diez cepas de BSF evaluadas en la promoción de crecimiento vegetal en ryegrass *(Lolium perenne* var. *One50) y* trébol rojo (*Trifolium pratense)* se demostró en este estudio, el potencial de las cepas de *Herbaspirillum* sp. AP21 y *Rhizobium* sp. T88 en la producción de biomasa seca de las plantas bajo condiciones limitantes de P en el suelo. Estos incrementos de producción de biomasa en las plantas forrajeras por las inoculaciones de estas cepas, muestran el papel beneficioso como PGPR, el cual puede estar atribuido por la solubilización de fosfatos insolubles. La producción de ácido glucónico en condiciones *in vitro* fue la principal causa señalada para la solubilización de las fuentes fosfóricas insolubles generando acidificación del medio y por ende la obtención de P disponible por las cepas. Además, la cepa *Herbaspirillum* sp. AP21 mostró capacidades de producción de siderórofos, actividad fitasa y fosfatasas ácida y alcalina, mientras que *Rhizobium* sp. T88 solo expresó actividad fosfatasa ácida y alcalina en medio líquido.

La evaluación de *Herbaspirillum* sp. AP21 y *Rhizobium* sp. T88 inoculadas individualmente, en las plantas asociadas de ryegrass y trébol rojo, bajo dos niveles de fertilización de DAP, permitió dilucidar que ambas cepas proporcionaron mayores cantidades de P disponible en el suelo, en la dosis de 75% de DAP, porque presentaron mayores cantidades de P lábil de las formas inorgánicas de P. Mientras que cuando se coinocularon las cepas, mostraron una tendencia de aumento en los contenidos de N, Ca y K en los tejidos vegetales, deduciendo que su efecto sinérgico puede proporcionar un incremento en la toma de nutrientes influyendo en el desarrollo y crecimiento de las plantas.

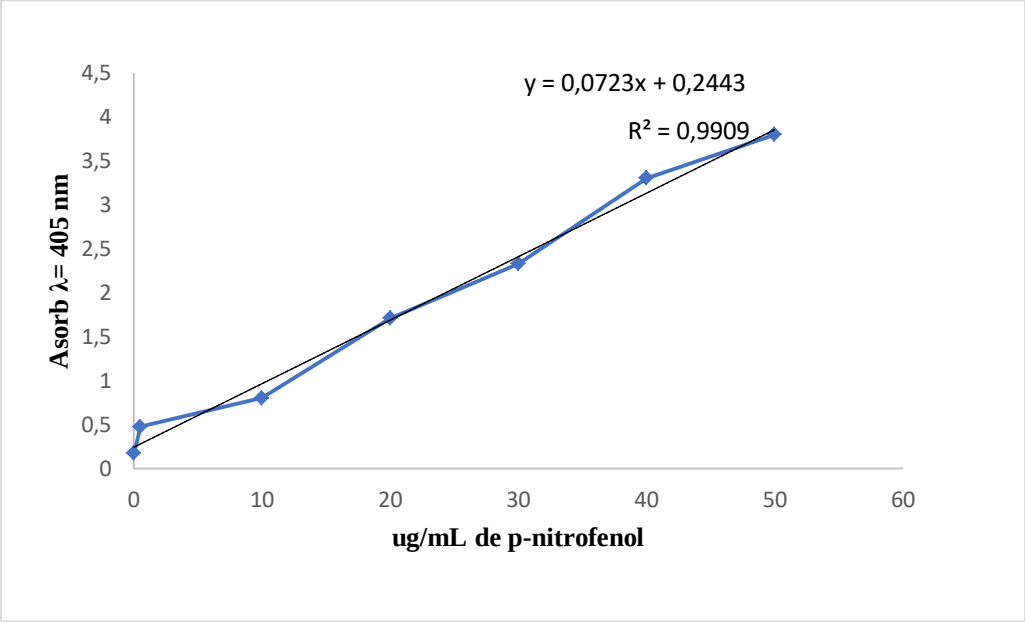
La reducción del 50% de la dosis del fertilizante soluble, junto con la inoculación de *Herbaspirillum* sp. AP21, proporcionó mayor eficiencia en la mineralización del Po del suelo, al incrementar la concentración de P disponible apartir de formas orgánicas lábiles y moderadamente lábiles, que favoreció la actividad de las enzimas fosfatasas ácida o alcalina, lo cual, se expresó de manera signifcativa en el suelo. Esta capacidad mineralizadora de fósforo orgánico se correlacionó con los resultados encontrados *in vitro* para esta cepa.

Este estudio sugiere que un método posible para mejorar la eficiencia de lo fertilizantes fosfatados en un cultivo de intersiembra de ryegrass y trébol rojo, puede consistir en la inoculación de *Rhizobium* sp. T88 y/o *Herbaspirillum* sp. AP21 combinando con dosis reducidas de fertilizantes solubles de hasta en un 25%. Aunque es necesario evaluar ambas cepas durante todo el tiempo productivo del cultivo de las forrajeras, estas cepas mostraron un potencial en mejorar las concentraciones de P disponible en el suelo, el cual, podría favorecer el crecimiento y la nutrición de las plantas que a posteriori repercuten positivamente en la producción ganadera.

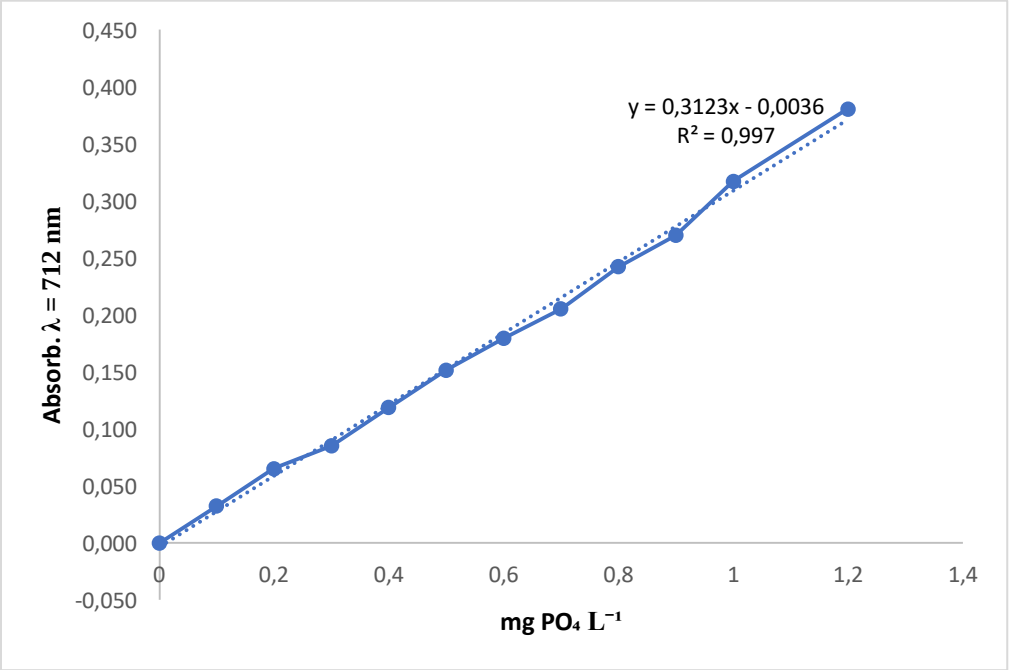
5.2 Recomendaciones

Es esencial realizar más estudios para evaluar la eficacia de las cepas en la intersiembra de ryegrass y trébol rojo en condiciones de campo antes de que puedan considerarse para las prácticas agrícolas. Además, otros estudios como el uso de técnicas de isótopos de (^{32}P), se deben realizar para rastrear más claramente la absorción de P de los fertilizantes aplicados a los tejidos vegetales en el futuro. También hacer exploraciones de estas cepas en el suelo para determinar sus capacidades de prosperar e interactuar con el suelo y los microbiomas naturales de las plantas, lo cual, será esencial para determinar su potencial completo para la biofertilización.

A. Anexo: Curvas de calibración



Anexo. Curva de calibración de *p*-nitrofenol



Anexo. Curva de calibración de fosfatos solubles.

B. Anexo: Fraccionamiento secuencial de P en el suelo de los tratamientos.

Tratam.	Descripción	Resina	Bicarbonato Pi	Bicarbonato Po	NaOH 0.1M Pi	NaOH 0.1M Po	HCl
		mg kg^{-1}					
T1	100% DAP+ 0% RF	21,31	26,18	68,01	262,1	174,88	46,7
T2	75% DAP + 25%RF	16,69	23,49	48,84	240,6	212,82	47,9
T3	50% DAP + 50% RF	16,51	20,79	44,04	244,2	183,89	49,5
T4	0% DAP + 100% RF	13,85	17,33	59,98	204,2	229,02	56,2
T5	75% DAP + 25%RF+AP21	19,18	23,97	74,02	245,4	171,29	53,9
T6	50% DAP + 50% RF+AP21	15,18	19,64	52,27	239,7	195,99	53,9
T7	75% DAP + 25%RF+T88	18,65	22,52	53,98	368,4	75,10	47,5
T8	50% DAP + 50% RF+T88	18,38	23,39	55,20	238,5	207,32	53,5
T9	75% DAP + 25%RF+AP21+T88	17,05	22,24	57,93	242,1	198,66	43,8
T10	50% DAP + 50% RF+AP21+T88	15,72	18,19	50,81	205,4	264,58	61,0

Anexo. Datos obtenidos en el fraccionamiento secuencial de P, según metoldogía Hedley (1982), en el suelo de los tratamientos.

C. Anexo: Datos de actividad fosfatasa ácida y alcalina en los suelos de los tratamientos.

Tratam.	Descripción	UP alcalina (µg PNPg^{-1} ss.h^{-1})	UP ácida (µg PNPg^{-1} ss.h^{-1})	pH suelo (promedio)
T1	100% DAP+ 0% RF	28,24	79,94	6,29
T2	75% DAP + 25%RF	34,31	76,82	6,32
T3	50% DAP + 50% RF	38,36	79,54	6,24
T4	0% DAP + 100% RF	29,52	87,60	6,28
T5	75% DAP + 25%RF+AP21	37,43	92,26	6,19
T6	50% DAP + 50% RF+AP21	41,65	74,37	6,21
T7	75% DAP + 25%RF+T88	23,90	71,26	6,36
T8	50% DAP + 50% RF+T88	31,51	80,80	6,26
T9	75% DAP + 25%RF+AP21+T88	31,88	74,12	6,29
T10	50% DAP + 50% RF+AP21+T88	39,77	80,40	6,24

Anexo. Datos de actividad fosfatasa ácida y alcalina en el suelo de los tratamientos.