

## TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

# EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS SOLUBILIZADORAS NATIVAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE NARANJO *NEWHALL*

## Effect of inoculation with native solubilizing bacteria on the growth of Newhall orange

Yfran Elvira, María de las M.<sup>1</sup> ; Collavino, Mónica M.<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Facultad de Ciencias Agrarias, Cátedra de Física. Sargento Cabral 2131, CP (3400) Corrientes, Argentina. E-mail: mariyfran077@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Facultad de Ciencias Agrarias, Cátedra de Microbiología. Instituto de Botánica del Nordeste (CONICET). Sargento Cabral 2131, CP (3400) Corrientes, Argentina. E-mail: mcollavino@agr.unne.edu.ar

### RESUMEN

Una de las principales limitantes de la producción en los suelos lateríticos es la baja disponibilidad de fósforo (P). Las bacterias del suelo conocidas como bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) tienen la capacidad de solubilizar formas insolubles de P inorgánico principalmente mediante la producción de ácidos orgánicos y la quelación de óxidos de calcio, hierro o aluminio. La inoculación con PSB seleccionadas para aumentar la población nativa puede movilizar P a partir de fuentes poco disponibles y por lo tanto mejorar el crecimiento de las plantas. El objetivo de este estudio fue evaluar la supervivencia y la competencia en el suelo de dos PSB nativas de suelo laterítico, *Enterobacter aerogenes* R4M-A y *Burkholderia caledonica* R4M-O, y analizar el efecto de la inoculación sobre el crecimiento de plantas de naranjo (*Citrus sinensis* L Osbeck) variedad Newhall. Las cepas *Enterobacter aerogenes* R4M-A y *Burkholderia caledonica* R4M-O fueron capaces de sobrevivir y competir eficazmente en el suelo, manteniendo una población mínima en suelo de 107/108 UFC g<sup>-1</sup> luego de 90 días de inoculadas. Se evidenció un efecto positivo de la inoculación y la fertilización sobre el crecimiento vegetal promoviendo una mayor biomasa total.

**Palabras clave:** Bacterias PSB, Citrus, PGPR, Vegetal.

### ABSTRACT

One of the main constraints to production in lateritic soils is the low availability of phosphorus (P). Soil bacteria known as phosphate-solubilizing bacteria (PSB), have the ability to solubilize insoluble forms of inorganic P mainly by producing organic acids and chelating calcium, iron or aluminum oxides. Inoculation with PSB selected to increase the native population can mobilize P from poorly available sources and thus improve plant growth. The aim of this study was to evaluate the survival and competition in soil of two PSB native to lateritic soil, *Enterobacter aerogenes* R4M-A and *Burkholderia caledonica* R4M-O, and to analyze the effect of inoculation on the growth of Newhall orange (*C. sinensis*) plants. Strains *Enterobacter aerogenes* R4M-A and *Burkholderia caledonica* R4M-O were able to survive and compete effectively in soil, maintaining a minimum soil population of 10<sup>7</sup>/10<sup>8</sup> CFU g<sup>-1</sup> after 90 days of inoculation. Inoculation and fertilization showed a positive effect on plant growth, promoting greater total biomass.

**Keywords:** PSB bacteria, Citrus, PGPR, Vegetable.





---

## INTRODUCCIÓN

En la República Argentina la citricultura es una actividad de significativa importancia en la fruticultura, registrándose una superficie de cultivo de 129.986 hectáreas, que genera un volumen de producción anual de 3880 mill. de toneladas de frutas frescas (campaña 2022/23). Alrededor del 70% de esta producción, está dirigida al mercado de frutas frescas. Dentro del grupo denominado naranjas de ombligo (*Citrus sinensis* L. Osbeck), de buena aceptación en los mercados europeos por su calidad, dulzura y tamaño de fruta, se destaca la variedad *Newhall* (derivada de *Washington navel*, originaria de California), de maduración temprana (Federcitrus, 2024).

Una de las principales limitantes de la producción en suelos lateríticos de la provincia de Misiones es la baja disponibilidad de fósforo (P), a pesar del alto contenido de P total. En estos suelos ácidos una proporción importante de los fosfatos solubles agregados es fijado por óxidos e hidróxidos de hierro (Fe) y aluminio (Al) o son adsorbidos por coloides, lo que pone de relieve las limitaciones del uso de fertilizantes de origen químico (Fernández López et al., 2006; Vázquez et al., 2011). Los microorganismos son esenciales en la dinámica del P en el suelo ya que desempeñan un rol importante en la disponibilidad de P para las plantas y su nutrición fosfórica (Al-Ali et al., 2018).

Un número considerable de bacterias denominadas comúnmente PSB (Phosphorous Solubilizing Bacteria) poseen la capacidad de solubilizar las formas de fósforo inorgánico no asimilables presentes en el suelo mediante la producción de ácidos orgánicos y/o la quelación de óxidos de calcio, hierro o aluminio (Antoun, 2012). Se ha investigado el uso de estas bacterias como inoculante en numerosas especies vegetales (Rosatto et al., 2014; Sánchez et al., 2014; Tejera et al., 2013), demostrando que esta práctica permite incrementar simultáneamente la absorción de fósforo y el rendimiento de los cultivos (Bashan et al., 2013; Ríos et al., 2016).

Los bioestimulantes son sustancias o microorganismos que, cuando se aplican a las plantas o al suelo, mejoran el crecimiento, la productividad y la tolerancia al estrés de los cultivos, sin ser fertilizantes ni pesticidas convencionales. Su función principal es optimizar los procesos fisiológicos y nutricionales de las plantas para maximizar su rendimiento y resistencia a condiciones adversas. Igualmente, aunque la liberación intencional de microorganismos en el medio ambiente se practica y se considera como un medio para mejorar la agricultura y la calidad del medio ambiente (Philippot et al., 2013); este enfoque requiere de un medio de seguimiento de los organismos después de su liberación. En cítricos poco se conoce sin embargo acerca de la utilización de bacterias con actividad solubilizadora de fósforo.

Las cepas utilizadas en nuestro trabajo, *Enterobacter aerogenes* R4M-A (EaR4M-A) y *Burkholderia caledonica* R4M-O (Bc R4M-O) fueron aisladas de la rizósfera de plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) crecidas en suelo rojo laterítico (Ultisol). Las mismas fueron seleccionadas por su alta actividad solubilizadora de fosfato tricálcico *in vitro* (Collavino et al., 2010). Estos autores encontraron que la inoculación con la PSB EaR4M-A, aislada de suelo rojo laterítico (Ultisol), estimuló el crecimiento de plantas de poroto en invernáculo, presentando un incremento significativo en la concentración de N y P foliar en presencia de P insoluble (fosfato tricálcico), y aumentando la materia seca aérea y radical, lo que afectó positivamente la actividad fotosintética mediante el aumento del área foliar. La cepa EaR4M-A, produce y libera AIA (ácido indol acético) al medio, lo que podría estar relacionado con el mayor desarrollo y proliferación de raíces y el incremento en la captación de agua y nutrientes. Por ende, el efecto positivo sobre el crecimiento en suelos deficientes en P puede resultar de la combinación sinérgica de la capacidad de estas bacterias para la producción de AIA y solubilización de P (Collavino et al., 2010). Estas cualidades indican que la cepa EaR4M-A, tiene una potencial utilidad como bioinoculante con beneficio económico y ecológico permitiendo un uso más eficiente de las reservas de P.

Con la finalidad de desarrollar estrategias alternativas de fertilización económica y de bajo costo ecológico en los suelos rojos, en el presente trabajo se plantea analizar el efecto de la inoculación con dos cepas PSB nativas, EaR4M-A, y BcR4M-O sobre el crecimiento de plantas de naranjo ombligo (*C. sinensis*) variedad *Newhall*, como así también evaluar la viabilidad y competencia de estas cepas en el suelo. Por lo que se trabajó con la hipótesis que la inoculación con las bacterias EaR4M-A y BcR4M-O mejora el crecimiento de plantas de naranjo ombligo (*Newhall*) a través de la movilización de las formas insolubles de fósforo presentes en el suelo.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Ensayos de inoculación de plantines de naranjo con bacterias solubilizadoras de fósforo.

**Material vegetal:** Se utilizaron plantines de Naranja ombligo (*C. sinensis* L. Osbeck) variedad *Newhall* de dos años provenientes de yemas certificadas por el INTA Bella Vista, injertadas sobre Limón Rugoso (*C. jambhiri* Lush). Los plantines al momento de la inoculación presentaron una altura promedio de 15,5 ( $\pm$  0,1) cm.

**Cepas bacterianas:** Los ensayos se realizaron con las cepas EaR4M-A y BcR4M-O aisladas de la rizósfera de plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) crecidas en un suelo laterítico de características similares al utilizado en el presente trabajo (Collavino et al. 2010). Para la inoculación, las bacterias se cultivaron en medio triptona de soja líquido (TSB) hasta alcanzar la fase exponencial, los cultivos fueron luego centrifugados, lavados y re-suspendidos en buffer fosfato salino (10 mM  $K_2PO_4-KH_2PO_4$ , 0,14 M NaCl, pH 7.2).

**Suelo utilizado:** El suelo corresponde a un Ultisol con pH ácido (5,26) con bajo contenido de P Bray II (6,40 mg  $kg^{-1}$ ), valor considerado muy bajo según Bray y Kurtz II, (1945). El suelo contenía 25,3 mg  $g^{-1}$  de materia orgánica, 1,1 mg  $g^{-1}$  de N, 4,05 cmol  $kg^{-1}$  de Ca intercambiable, 1,24 cmol  $kg^{-1}$  de Mg intercambiable y 0,44 cmol  $kg^{-1}$  de K intercambiable.

**Inoculación:** Las raíces desnudas de los plantines fueron lavadas con agua de canilla. Luego las raíces de cada plantín fueron sumergidas en 300 mL de suspensión bacteriana en concentración de  $10^8$  bacterias por  $mL^{-1}$ , y se procedió al trasplante en macetas de 10 L de capacidad en suelo rojo misionero (Kandiudult). Luego del trasplante, se inoculó el cuello de la raíz del plantín con el volumen restante de la suspensión. En los tratamientos sin inoculante bacteriano, se agregó el mismo volumen (300 mL) de buffer fosfato salino libre de bacterias. Se trabajó con cinco plantas por cada tratamiento.

Las plantas se mantuvieron en un invernáculo de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), con temperaturas medias de 25-30°C y manteniendo mediante riegos la humedad del suelo al 80% de la capacidad de campo. El ensayo duró dos años.

Se probaron los siguientes tratamientos de inoculación:

Tratamientos	Fertilización
Testigo (sin inoculación)	Sin aporte de fosfato tricálcico
Inoculación con BcR4M-O	
Inoculación con EaR4M-A	
Coinoculación con BcR4M-O y EaR4M-A	
Testigo (sin inoculación)	Con aporte de fosfato tricálcico
Inoculación con BcR4M-O	
Inoculación con EaR4M-A	
Coinoculación con BcR4M-O y EaR4M-A	

Por tratamiento se realizaron 5 repeticiones. En los tratamientos con fertilización fosfatada, se realizó una única aplicación al inicio del ensayo con fosfato tricálcico con dosis de 22,9 mg  $P_2O_5 kg^{-1}$  de suelo.

### Parámetros evaluados

#### 1. Persistencia de las cepas *BcR4M-O* y *EaR4M-A* en suelo rojo.

Para analizar la capacidad de las cepas BcR4M-O y EaR4M-A de sobrevivir y competir en el suelo rojo, fue necesario previamente obtener mutantes cromosomales espontáneos resistentes a rifampicina que permitieran la selección de estas PSB del resto de la población presente en las muestras de suelo.

##### 1.1. Ensayos de supervivencia y competencia de las bacterias en suelo rojo.

La capacidad de las cepas BcR4M-O y EaR4M-A de sobrevivir y competir en suelo rojo fue evaluada mediante la inoculación en suelo y el seguimiento del número de bacterias por recuento en placa. En los ensayos de competencia se trabajó con suelo rojo no estéril, mientras que en los ensayos de supervivencia el suelo fue esterilizado en autoclave por 40 minutos. Cabe destacar que los resultados del recuento en suelo esterilizado y



en suelo no esterilizado no son directamente comparables, dado que el proceso de autoclavado introduce una modificación física y química sustancial en el suelo, más allá de la eliminación de la flora competidora.

Para la inoculación las cepas a estudiar crecieron en medio TSA hasta alcanzar fase exponencial con una  $DO_{600}$  aproximada de una unidad. Las suspensiones bacterianas fueron centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos y resuspendidas en buffer salino. Por cada cepa a estudiar se inoculó 200 g de suelo con 30 ml de esta suspensión la cual tenía una concentración, estimada por recuento en placa, de  $10^{10}$  bacterias por ml. Las macetas inoculadas se mantuvieron bajo condiciones de ambiente controlado ( $27 \pm 1/22 \pm 2^\circ\text{C}$ , temperatura de día / temperatura de la noche, y 55-60% de humedad relativa).

Se probaron los siguientes tratamientos, con tres repeticiones: para ensayo de supervivencia 1) Testigo; 2) Cepa salvaje de EaR4M-A, 3) Cepa salvaje de BcR4M-O; 4) Mutante EaR4M-A; 5) Mutante BcR4M-O; para el ensayo de Competencia 1) Testigo; 2) Mutante EaR4M-A; 3) Mutante BcR4M-O

Para el ensayo de supervivencia se inoculó el suelo estéril con 30 ml de suspensión bacteriana, con una densidad final de  $10^9$  bacterias  $\text{g}^{-1}$  de suelo y se tomaron muestras de suelo a intervalos de 0, 7, 15, 30, 60 y 90 días a las que se les determinó el número de bacterias viables mediante dilución y recuento en placas con medio TSA.

Los recuentos se realizaron agregando 10 ml de buffer salino a cada muestra (1 g de suelo), esta mezcla fue mantenida en agitación (200 rpm) por 30 minutos y luego se realizaron diluciones y recuento en placa con medio TSA con rifampicina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para el ensayo de competencia y sin antibiótico para el estudio de la supervivencia.

**2. Parámetros de crecimiento de naranjo *Newhall*.** Luego de la brotación de primavera en el segundo año de ensayo, se realizó la recolección de las plantas en macetas, a fin de determinar el efecto de la inoculación sobre los parámetros asociados al crecimiento: contenido de materia seca (aérea y radical), producida en dicho período.

**Análisis estadístico:** Se trabajó con un diseño experimental de bloques completos al azar con cinco repeticiones. Los datos obtenidos fueron sometidos a las pruebas de normalidad mediante prueba de bondad de ajuste con el estadístico Shapiro-Wilks modificado ( $\alpha=0,05$ ) y se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) utilizando el software Infostat (Di Rienzo et al., 2023). Para analizar la interdependencia de variables se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y se estandarizaron los datos para realizar el análisis sobre la matriz de correlación de las variables. Para el estudio de la supervivencia y competencia se realizó una previa transformación de los datos a  $\text{Log}_{10}$  (Steel y Torrie, 1992).

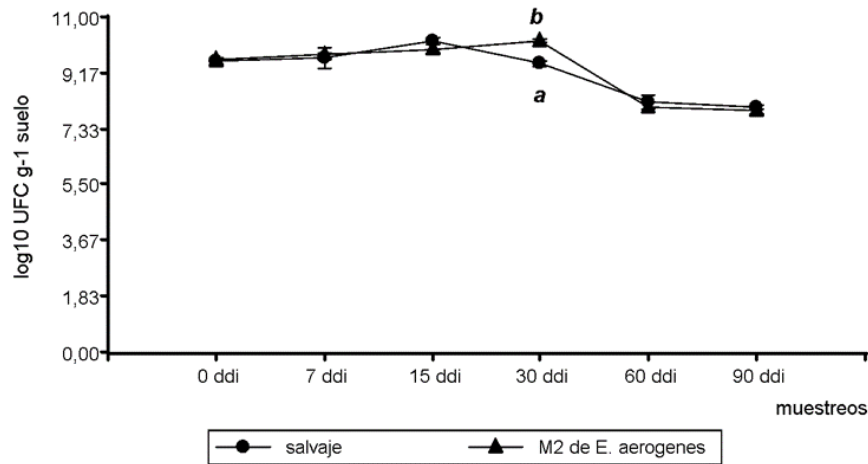
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Persistencia de las cepas EaR4M-A y BcR4M-O en suelo rojo.

#### 1.1. Ensayos de supervivencia de las bacterias en suelo rojo

Luego del proceso de obtención de mutantes y de comprobar que la mutación  $\text{Rif}^+$  no afectó la tasa de crecimiento ni la actividad solubilizadora de fósforo en condiciones *in vitro* de las cepas M2 de EaR4M-A y M3 de BcR4M-O, se procedió a analizar la supervivencia de estas cepas, y de la cepa salvaje, a fin de determinar si las mutantes seleccionadas no se encuentran afectadas en su capacidad de sobrevivir en el suelo.

Los resultados muestran una tasa de supervivencia muy similar entre la mutante M2 de EaR4M-A y su cepa salvaje, (Figura 1). En los primeros 30 días después de la inoculación la cepa salvaje y su mutante M2 mantienen una curva poblacional muy similares, excepto a los 30 días donde la mutante M2 de EaR4M-A mantiene su población (en valores de  $1,6 \times 10^{10}$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ) mientras que la cepa salvaje muestra una disminución poblacional (a valores de  $2,9 \times 10^9$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de suelo). Luego se evidencia una disminución poblacional abrupta de ambas cepas a valores de  $10^7/10^8$  UFC por gramo de suelo en el periodo comprendido entre los 60 y 90 días después de la inoculación. Los resultados indican que la mutación no afectó la capacidad de sobrevivir en el suelo de la cepa M2 de EaR4M-A.

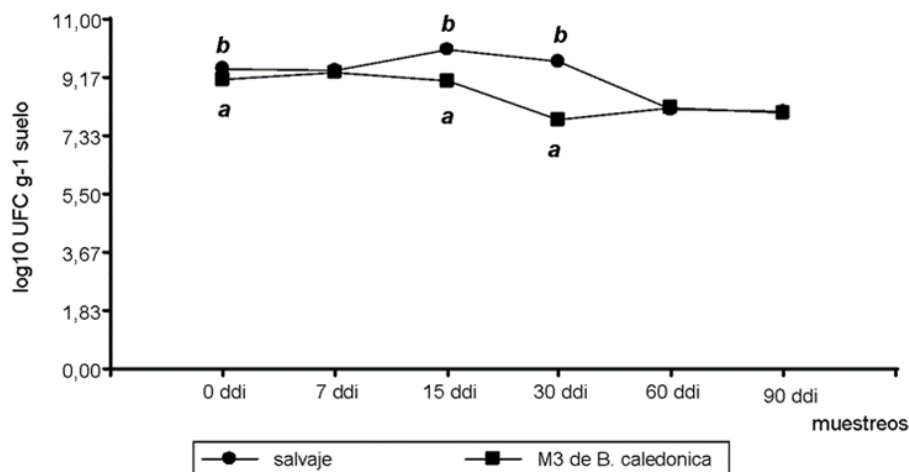


**Figura 1.** Supervivencia en suelo de EaR4M-A y su mutante Rif<sup>+</sup> M2. Letras diferentes en el muestreo 30 días después de la inoculación (ddi) indican diferencias significativas según prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). No se señalan letras en el resto de los muestreos ya que no se encontraron diferencias significativas.

Con respecto al comportamiento de la población de BcR4M-O y su mutante M3 (Figura 2), se observa un claro aumento poblacional de la cepa salvaje en los primeros 30 días después de la inoculación, mientras que su mutante M3 disminuyó su población en este período. Por lo tanto debemos tomar con mucha cautela el posterior estudio de competencia de este clon Rif<sup>+</sup>, ya que su capacidad de sobrevivir en el suelo se encuentra afectada.

Estudiar la capacidad de supervivencia en el suelo de las cepas salvajes y sus respectivas mutantes es necesario, ya que nos permite conocer como va a evolucionar el inóculo con el fin de calibrar los riesgos y beneficios de la introducción de microorganismos ya sea natural o genéticamente modificado al suelo.

Nuestros resultados nos permiten concluir, que las cuatro cepas ensayadas mantuvieron una población mínima de  $10^7/10^8$  UFC por gramo de suelo, población que se mantuvo a los 60 y 90 días después de la inoculación. Esta característica de las cepas es importante considerando que una de las condiciones esenciales que debe cumplimentar un inoculante es mantener una población umbral mínima necesaria para desencadenar el efecto biológico en la planta.



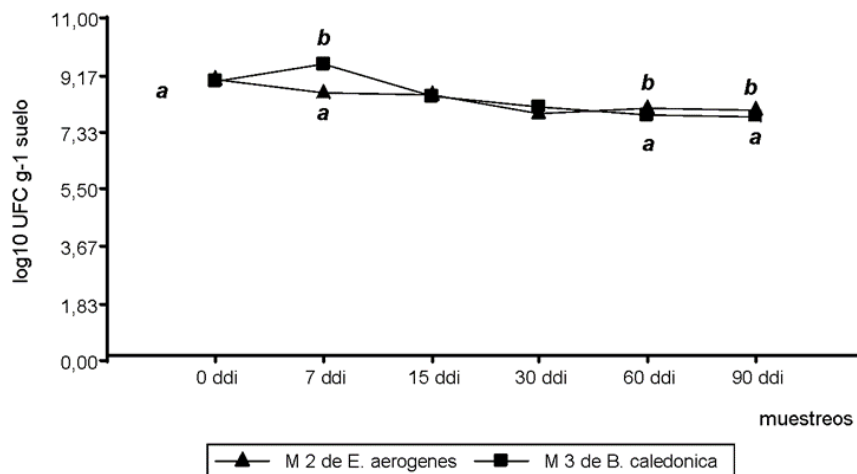
**Figura 2.** Supervivencia en suelo de BcR4M-O y su mutante Rif<sup>+</sup> M3. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). No se señalan letras en los muestreos que no se encontraron diferencias significativas.

### 1.2. Ensayos de competencia de las bacterias en suelo rojo

Luego de comprobar que la mutación Rif<sup>+</sup> no afectó la tasa de crecimiento ni la actividad solubilizadora *in vitro* de fósforo y determinar la supervivencia en suelo de las cepas EaR4M-A y BcR4M-O y de sus mutantes resistentes a la rifampicina, se procedió a realizar el estudio de competencia en el suelo. Independientemente de los factores que condicionan una buena colonización, es necesario monitorear el inóculo introducido, con el fin de evaluar su interacción con otros microorganismos en el suelo.

Se inoculó el suelo no esterilizado, para determinar la competencia de los clones Rif<sup>+</sup> M2 de EaR4M- y M3 de BcR4M-O. Se tomaron muestras de suelo a intervalos de 0, 7, 15, 30, 60 y 90 días a las que se les determinó número de bacterias viables mediante dilución y recuento en placas con medio TSA con rifampicina 100 µg/ml. En la Figura 3, se puede apreciar la dinámica poblacional de las cepas Rif<sup>+</sup> en el tiempo. Se observa que en los primeros 7 días la cepa M3 de BcR4M-O, alcanza una población de  $3,2 \times 10^9$  UFC, mientras que la cepa M2 de EaR4M-A presentó menor número de colonias ( $4 \times 10^8$  UFC). A los 15 días de la inoculación la población de ambas mutantes, M2 de EaR4M-A y M3 de BcR4M-O, comienza a declinar, hasta llegar a valores de  $10^8/10^7$  UFC respectivamente en los dos últimos muestreos. A partir de los 60 días de la inoculación, la cepa M2, mantiene valores significativamente mayores que M3. Sin embargo, este resultado no es concluyente debido a que la cepa M3 de BcR4M-O muestra estar afectada en su capacidad de sobrevivir en suelo, lo que puede afectar por ende su competencia.

Nuestros resultados indican que, aunque el número de células bacterianas se redujo por debajo de la tasa de aplicación inicial de  $10^9$  UFC, en ambas cepas el número de células se estabilizó con valores del orden de  $10^8$  UFC para la cepa M2 de EaR4M-A y  $10^7$  UFC para la cepa M3 de BcR4M-O, representan el 90 y 92% de la población inicial respectivamente. Por lo tanto, se considera que las dos cepas mantuvieron una densidad poblacional alta en el periodo de tiempo evaluado (90 días) y se podría concluir que ambas cepas son competitivas en el tiempo.



**Figura 3.** Ensayo de competencia en suelo de las cepas mutantes Rif<sup>+</sup> M2 de *EaR4M-A* y M3 de *BcR4M-O*. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). No se señalan letras en los muestreos que no se encontraron diferencias significativas.

**2. Parámetros de crecimiento de naranjo *Newhall*.** El análisis de varianza demostró que los tratamientos aplicados produjeron efectos significativamente diferentes sobre las variables de crecimiento analizadas, excepto para la materia seca aérea. Las medias de los tratamientos y su diferencia estadística según la prueba de Tukey se presentan en la Tabla 1.

En general no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos sin fosfato tricálcico (FTC), excepto la inoculación con EaR4M-A que presentó menor materia seca radical y total respecto del testigo y de la coinoculación.

En contraste, en los tratamientos fertilizados e inoculados presentaron los mayores valores en las variables de crecimiento de la planta, (excepto la materia seca aérea, que no se diferenció significativamente entre tratamientos) comparados con las plantas sin inocular. En las inoculaciones simples se observó además un incremento significativo en materia seca total. Cabe destacar que en las plantas testigo fertilizadas se obtuvo también



un buen crecimiento y desarrollo, sin síntomas de deficiencias nutritivas evidentes. Esto podría deberse a la presencia de microorganismos nativos del suelo, capaces de solubilizar el FTC aplicado, lo cual podría tener a su vez un efecto “priming” sobre la microbiota del suelo, activándola y favoreciendo aquellos microorganismos nativos con capacidad de solubilización.

Comparando las plantas fertilizadas y no fertilizadas, las inoculaciones simples con BcR4M-O y EaR4M-A fertilizadas superaron significativamente a las inoculaciones simples sin fertilizar en las variables producción de materia seca radical y total.

Resultados semejantes obtuvieron Cisneros Rojas et al., (2017) evaluando el efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos como *Kocuria sp.* y *Bacillus subtilis* sobre el desarrollo de plántulas de café. La inoculación con estas bacterias aumentó la disponibilidad de fósforo en el sustrato y promovió el desarrollo de las plántulas, lo que sugiere su potencial aplicación en otros cultivos, incluidos los cítricos.

Asimismo Lucero et al., (2017) estudiaron el efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato en plantas soja y maíz, encontraron que los tratamientos en los que se inoculó con las cepas *Enterobacter sp.* J49 y *Serratia sp.* S119, mostraron una promoción del crecimiento vegetal en las dos plantas analizadas. Estos estudios sugieren que la inoculación con bacterias solubilizadoras de fósforo nativas puede ser una estrategia efectiva para mejorar la disponibilidad de fósforo en el suelo y promover el crecimiento de plantas cítricas. Sin embargo, es importante considerar las condiciones específicas de cada cultivo y región para optimizar los resultados.

Concluyendo, la inoculación sin fertilización no afectó positivamente el crecimiento de la planta y, la inoculación con EaR4M-A disminuyó la biomasa radical. En contraste, los tratamientos fertilizados e inoculados con EaR4M-A o BcR4M-O incrementaron en forma significativa la biomasa vegetal total.

**Tabla 1.** Efecto de la inoculación con PSB sin y con FTC sobre la producción de materia seca de plantas de Naranja oblonga (*Citrus sinensis*) var. *Newhall* luego de dos años de ensayo.

Tratamientos	Fertilización	Materia Seca Aérea (g)	Materia Seca Radical (g)	Materia Seca Total (g)	Raíz/Aéreo
Testigo (sin inoculación)		58,04 a	59,84 bc	117,88 ab	1,02 a
Inoculación con BcR4M-O	Sin aporte de fosfato tricálcico	59,70 a	53,66 ab	113,36 ab	0,90 a
Inoculación con EaR4M-A		57,10 a	48,93 a	106,02 a	0,88 a
Coinoculación con BcR4M-O y EaR4M-A		62,31 a	62,50 bc	124,81 b	1,00 a
Testigo (sin inoculación)		59,12 a	61,14 bcd	120,26 bc	1,06 bc
Inoculación con BcR4M-O	Con aporte de fosfato tricálcico	62,08 a	70,63 d	132,72 d	1,12 c
Inoculación con EaR4M-A		63,36 a	68,23 cd	131,59 d	1,06 bc
Coinoculación con BcR4M-O y EaR4M-A		61,05 a	58,70 b	119,75 b	0,96 abc

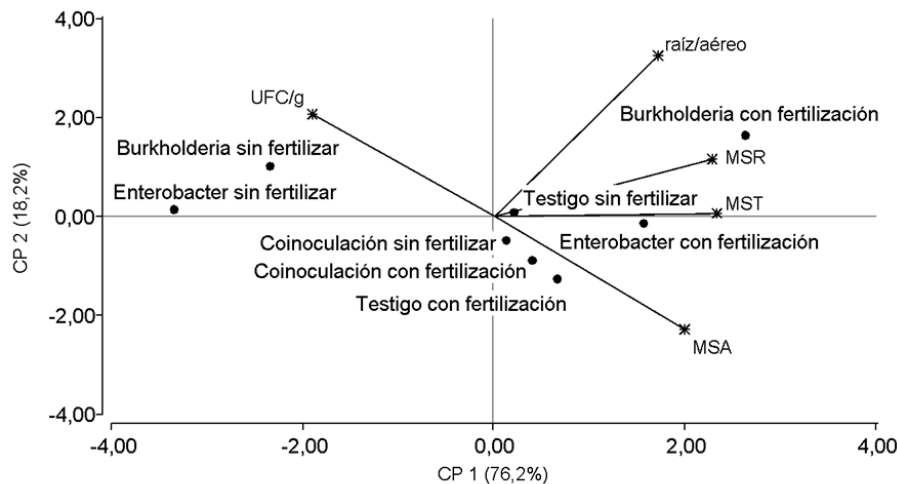
Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas según prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

Para analizar en conjunto los efectos de la inoculación sobre las variables crecimiento vegetal y número de solubilizadoras totales se realizó un estudio multivariado (Análisis de Componentes Principales -ACP-) (Figura 4).

En la Figura 4 se muestra la representación gráfica del ACP de las distintas variables estudiadas en los tratamientos evaluados.

Los resultados señalan que en los ensayos sin FTC las dos primeras componentes explican el 94,4 % de la variabilidad total en las observaciones (ver Figura 4).

Se puede visualizar que la CP1 separa los tratamientos inoculados con EaR4M-A y BcR4M-O con fertilización, los cuales se encuentran más asociados a los parámetros de crecimiento, como ser producción de materia seca radical (MSR) aérea (MSA) y total (MST) y relación biomasa radical/aérea mientras que la densidad de solubilizadoras totales en el suelo (UFC/g de suelo) se asoció a EaR4M-A y BcR4M-O sin fertilización.



**Figura 4.** Biplot resultante del ACP de las variables de crecimiento vegetal y número de solubilizadoras totales en los tratamientos evaluados.

Esto pone de relieve que la estimulación del crecimiento radical puede mejorar indirectamente la absorción de nutrientes mediante una mayor exploración del suelo, traduciéndose en un efecto final sobre el crecimiento y la nutrición vegetal.

Los resultados destacan la complejidad inherente a la interacción planta-microorganismo, un proceso influenciado no solo por las características intrínsecas de las bacterias, sino también por su capacidad para colonizar eficazmente las raíces y formar biopelículas (Loera-Muro & Caamal-Chan, 2023; Al-Ali et al., 2018, Viuega-Góngora et al., 2020), entre otros factores. Además, la planta juega un papel activo mediante una estricta regulación de los microorganismos con los que interactúa.

## CONCLUSIONES

La inoculación con bacterias EaR4M-A o BcR4M-O con fosfato tricálcico presentó un efecto positivo sobre el crecimiento de la planta, promoviendo una mayor biomasa total. Estos resultados enfatizan la importancia de la acción microbiana solubilizadora que promueve la movilización del P en el suelo, aumentando su disponibilidad en suelos ácidos.

Asimismo, para que la inoculación con bacterias PGPR sea exitosa es requisito indispensable conocer su supervivencia y competencia en el suelo. Para esto se estudió cuidadosamente el comportamiento de las cepas marcadas con genes de resistencia a la rifampicina para el control luego de su introducción en el suelo. Las cepas EaR4M-A y BcR4M-O demostraron ser capaces de sobrevivir y ser altamente competitivas en el suelo, manteniendo una población umbral mínima, que demostró tener un efecto biológico en la planta, promoviendo su crecimiento.

## REFERENCIAS

- Al-Ali, A., Deravel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., y Jacques, P. (2018). Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 29910–29920. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0469-1>
- Antoun, H. (2012). Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Engineering*, 46, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.09.446>



- Bashan, Y., Kamnev, A. A., y de-Bashan, L. E.** (2013). A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 49, 1–2. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0756-4>
- Bray, R. H., y Kurtz, L. T.** (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science*, 59, 39–45.
- Cisneros-Rojas, C. A., Sánchez-de Prager, M., y Menjivar-Flores, J. C.** (2017). Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 149–158. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.22021>
- Collavino, M., Sansberro, P., Mroginski, L., y 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. *Biology and Fertility of Soils*, 46, 727–738. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0480-x>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., y Robledo, C. W.** (2023). InfoStat (Versión 2023) [Software]. Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>
- Federicitrus.** (2024). *La actividad citrícola argentina* [Archivo PDF]. <http://www.federicitrus.org/noticias/upload/informes/Act%20Citricola%2012.pdf>
- Fernández López, C., Mendoza, R., y Vázquez, S.** (2006). Fracciones de fósforo en suelos de Corrientes con producción citrícola, arrocería y pastoril. *Ciencia del Suelo*, 24(2), 161–168. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1850-20672006000200008](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-20672006000200008)
- Lucero, C. T., Lorda, G. S., y Taurian, T.** (2017). Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato en plantas soja y maíz. *Agrotecnia*, 25, 36–46. <https://doi.org/10.30972/agr.0252465>
- Loera-Muro, A., y Caamal-Chan, M. G.** (2023). Biopelículas en la rizósfera y su papel en la producción de compuestos antimicrobiales en el suelo. *Terra Latinoamericana*, 41, e1733. <https://doi.org/10.28940/terra.v41i0.1733>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., y van der Putten, W. H.** (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Ríos-Rocafull, Y., Dibut-Álvarez, B., Rojas-Badía, M., Ortega-García, M., Arozarena-Daza, N., y Rodríguez-Sánchez, J.** (2016). Interacción de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* y hortalizas de raíz. *Cultivos Tropicales*, 37(Especial), 28–32. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2799.0640>
- Rosatto-Moda, L., Mello-Prado, Renato de, Castellanos-González, L., Reyes-Hernández, A., Caione, G., y Silva-Campos, C. N.** (2014). Solubilización de fuentes de fósforo asociadas a un compuesto orgánico enriquecido con biofertilizantes. *Agrociencia*, 48, 489–500. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v48n5/v48n5a3.pdf>
- Sánchez, D. B., Gómez, R. M., García, A. M., y Bonilla, R. R.** (2014). Phosphate solubilizing bacteria isolated from *Pennisetum clandestinum* associate to livestock systems in the Andean area. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 17(2), 423–431. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v17n2/v17n2a13.pdf>
- Steel, R., y Torrie, J.** (1992). *Bioestadística: Principios y procedimientos* (2.ª ed.). McGraw-Hill. <https://clea.edu.mx/biblioteca/Steel%20Robert%20G%20-%20Bioestadística%20Principios%20Y%20Procedimientos%202ed.pdf>
- Tejera-Hernández, B., Heydrich-Pérez, M., y Rojas-Badía, M. M.** (2013). Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 357–364. [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v24n02\\_357.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v24n02_357.pdf)
- Vázquez, S., Morales, L. A., Fernández López, C., y Dalurzo, H. C.** (2011). Fertilización fosfatada y fracciones de fósforo en Alfisoles, Ultisoles y Oxisoles. *Ciencia del Suelo*, 29(2), 161–171. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1850-20672011000200005](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-20672011000200005)
- Viruega-Góngora, V. I., Acatitla-Jácome, I. S., Reyes-Carmona, S. R., Baca, B. E., y Ramírez-Mata, A.** (2020). Spatio-temporal formation of biofilms and extracellular matrix analysis in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 367(4), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa037>

