



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio del efecto de inoculantes bacterianos con
propiedades PGP (Plant Growth Promoting) en suelos de
cultivo de cítricos

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Girona Garcia, Anais Maria

Tutor/a: Pascual España, Bernardo

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

Título: Estudio del efecto de un inoculante bacteriano con propiedades PGP (Plant Growth Promoting) en suelos de cultivos de cítricos

RESUMEN

La agricultura intensiva, ha recurrido durante los últimos años al uso excesivo de fertilizantes químicos que han permitido aumentar los rendimientos de los cultivos. En ocasiones, esta práctica ha desencadenado una dependencia hacia este tipo de productos que lejos de ser beneficiosos, encarecen los costes, contaminan aguas y dejan suelos degradados, salinizados y con un desajuste del equilibrio microbiano naturalmente establecido. Las recientes medidas aprobadas por las Naciones Unidas, la agenda 2030 y la Unión Europea, con la estrategia de la granja a la mesa (en la que uno de sus principales objetivos es reducir el uso de fertilizantes un 20% y las pérdidas de nutrientes al menos un 50% sin deteriorar el suelo) hacen evidente la necesidad de cambio en el sector de la agricultura. Para solventar este problema, es necesario llevar a la agricultura hacia un enfoque más técnico, basando la dosis de los fertilizantes en los requerimientos nutricionales de los cultivos, análisis de suelo y/o foliares y conociendo la eficiencia del uso de fertilizantes. Por otro lado, la utilización de biofertilizantes, productos biológicos elaborados a base de microorganismos, como alternativa a los fertilizantes químicos, permiten incrementar los rendimientos de los cultivos entre un 17% y 50%, mejorando la fertilidad del suelo.

El objetivo de este Trabajo Final de Máster es estudiar el efecto de la inoculación de un biofertilizante (Micropull) preparado a base de bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, PGP (por sus siglas en inglés, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Se trata de un biofertilizante a base de una cepa comercial de amplio espectro de acción PGP, *Bacillus Megaterium* CECT 9689. Las propiedades PGP atribuibles a la cepa y que serán objeto de estudio son: fijación de N atmosférico, solubilización de fósforo, movilización de potasio, producción de sideróforos y proteasas. El estudio se realiza en dos explotaciones de cítricos situadas al sur de la provincia de Alicante.

En cada una de las explotaciones analizadas se controlaron parcelas tratadas y parcelas testigo, marcando en cada una de ellas, 3 parcelas experimentales donde previo a la inoculación, se tomaron muestras a nivel rizosférico para los análisis físico-químicos y microbiológicos. El tratamiento realizado ha sido el mismo en cada una de las parcelas: 3 aplicaciones de Micropull a una dosis 2 L ha^{-1} mediante fertirrigación, desde el inicio de la brotación y espaciando las aplicaciones 3 semanas. 3-4 semanas después de la última aplicación, se volvieron a tomar muestras en los mismos puntos para estudiar la evolución microbiológica. En el momento de la recolección, se tomaron datos de calibre y peso de los frutos en los mismos puntos experimentales. Una vez recopilados los datos de los resultados, se ha realizado un análisis estadístico de los mismos.

Micropull ha incrementado las poblaciones generales de microorganismos en el suelo, las poblaciones fijadoras de nitrógeno y la fijación de nitrógeno en ambas parcelas, por otro lado, la mineralización de fósforo inorgánico se ha incrementado en una de las fincas experimentales. El resto de los parámetros analizados no ha mostrado incrementos significativos tras la aplicación del biofertilizante. La producción final de las parcelas tratadas con Micropull ha sido mayor que las parcelas testigo. Tras la realización del ensayo, se considera que podría mejorarse el diseño experimental, por lo que se ha planteado un nuevo enfoque de trabajo que permita obtener conclusiones más consistentes a partir de los resultados obtenidos.

Palabras clave: Análisis microbiológico, Bacterias, Biofertilizante, Cítricos, Mecanismos, Propiedades.

Autor del TFM: Dña. Anaís Girona García
Tutor Académico: Bernardo Pascual España
Cotutor colaborador: Dña. Mónica Perdices Hoyo
Valencia, 10 de junio de 2022

Title: Study of the effect of a bacterial inoculant with PGP (Plant Growth Promoting) properties in citrus crop soils.

ABSTRACT

In recent years, intensive agriculture has resorted to the excessive use of chemical fertilizers to increase crop yields. Sometimes, this practice has triggered a dependence on this type of products that, far from being beneficial, increase costs, pollute water, and leave degraded, salinized soils with an imbalance in the naturally established microbial balance. The recent measures approved by the United Nations, the 2030 agenda and the European Union, with the "Farm to Fork" strategy (being whose one of its main objectives is to reduce the use of fertilizers by 20% and nutrient losses by at least 50% without deteriorating the soil), make evident the need for change in the agricultural sector. To solve this problem, it is necessary to take agriculture towards a more technical approach, basing fertilizer dosage on crop nutritional requirements, soil and/or foliar analysis and knowing the efficiency of fertilizer use. On the other hand, the use of biofertilizers, biological products made from microorganisms, as an alternative to chemical fertilizers, can increase crop yields between 17% and 50%, improving soil fertility.

The objective of this Master's Thesis is to study the effect of the inoculation of a biofertilizer (Micropull) prepared from PGP bacteria (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGP). It is a biofertilizer based on a commercial strain with a broad spectrum of PGP action, *Bacillus megaterium* CECT 9689. The PGP properties attributable to the strain that will be studied are: atmospheric N fixation, phosphorus solubilization, potassium mobilization, production of siderophores and proteases. The study is carried out in two citrus farms located south of the Alicante province.

Each of the farms had a control test and a treated area, marking in each of them, 3 experimental plots where, prior to inoculation, samples were taken at rhizospheric level for physicochemical and microbiological analysis. The treatment was the same in each of the plots: 3 applications of Micropull at 2 L ha⁻¹ by fertigation, starting at the beginning of sprouting and spacing the applications 3 weeks apart. 3-4 weeks after the last application, samples were taken again at the same points to study the microbiological evolution. At the time of harvest, fruit caliper and weight data will be taken at the same experimental points. Once the data of the results are collected, a statistical analysis of the results is carried out to study and compare the results obtained from the control and treated of the various mechanisms carried out.

Micropull has allowed to increase the general populations of microorganisms in the soil, the nitrogen fixing populations and nitrogen fixation in both plots, on the other hand, the mineralization of inorganic phosphorus has increased in the experimental farm 1. After analyzing the results, it is considered that the experimental design could be improved, so a new working approach has been proposed that allows obtaining more consistent conclusions from the results

obtained. Key words: Bacteria, Biofertilizer, Citrus, Microbiological analysis, Mechanisms, Properties,

Títol: Estudi de l'efecte d' un inoculant bacterian amb propietats PGP (Plant Growth Promoting) en sòls de conreus de cítrics.

RESUM

L'agricultura intensiva, ha portat durant els últims anys a l'ús excessiu de fertilitzants químics que han permés augmentar els rendiments dels cultius. A vegades, aquesta pràctica ha desencadenat una dependència cap a aquesta mena de productes que lluny de ser beneficiosos, encareixen els costos, contaminen aigües i deixen sòls degradats, salinitzats i amb un desajustament de l'equilibri microbià naturalment establert. Les recents mesures aprovades per les Nacions Unides, l'agenda 2030 i la Unió Europea, amb l'estratègia de la granja a la taula (en la que el seu un dels seus principals objectius és reduir l'ús de fertilitzants un 20% i les pèrdues de nutrients almenys un 50% sense deteriorar el sòl) fan evident la necessitat de canvi en el sector de l'agricultura. Per a solucionar aquest problema, és necessari portar a l'agricultura cap a un enfocament més tècnic, basant la dosi dels fertilitzants en els requeriments nutricionals dels cultius, anàlisis de sòl i/o foliars i conèixer l'eficiència de l'ús de fertilitzants. D'altra banda, l'utilització de biofertilizants, productes biològics elaborats a base de microorganismes, com a alternativa als fertilitzants químics, permeten incrementar els rendiments dels cultius entre un 17% i 50%, millorant la fertilitat del sòl.

L'objectiu d'aquest Treball Final de Màster és estudiar l'efecte de la inoculació d'un biofertilizant preparat a base de bacteris PGP Bacteris Promotors del Creixement Vegetal, (per les seues sigles en anglés, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Es tracta d'un biofertilizant a base d'un cep comercial d'ampli espectre d'acció PGP, *Bacillus megaterium* CECT 9689. Les propietats PGP atribuïbles al cep i que seran objecte d'estudi són: fixació de N atmosfèric, solubilització de fòsfor inorgànic, mobilització de fòsfor orgànic, mobilització de potassi, producció de sideròforos i proteasas. L'estudi es realitza en dues explotacions de cítrics situades al sud de la província d'Alacant.

Per a això, cadascuna de les explotacions ha comptat amb una prova testimoni i una zona tractada, marcant en cadascuna d'elles, 3 parcel·les experimentals on previ a la inoculació, es van prendre mostres a nivell rizosfèric per als anàlisis físico-químics i microbiològics. El tractament realitzat ha sigut el mateix en cadascuna de les parcel·les: 3 aplicacions de Micropull a 2 L ha⁻¹ per fertirrigació, començant a l'inici de la brotació i espaiant les aplicacions 3 setmanes. 3-4 setmanes després de l'última aplicació, es van tornar a prendre mostres en els mateixos punts per a estudiar l'evolució microbiològica. En el moment de la recol·lecció, es van prendre dades de calibre i pes dels fruits en els mateixos punts experimentals. Una vegada recopilades les dades dels resultats, s'ha realitzat una anàlisi estadística dels mateixos

Micropull ha permés incrementar les poblacions generals de microorganismes en el sòl, les poblacions fixadores de nitrogen i la fixació de nitrogen en totes dues parcel·les, d'altra banda, la mineralització de fòsfor inorgànic incrementa en la finca experimental 1. Després de la realització de l'assaig, es considera que es podria millorar el disseny experimental, per la qual cosa s'ha plantejat un nou enfocament de treball que permeta obtenir conclusions més consistents a partir dels resultats obtinguts.

Paraules clau: Anàlisi microbiològica, Bacteris, Biofertilizant, Cítrics, Mecanismes, Propietats,

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a Mónica Perdices y a la empresa Ceres Biotics, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de fin de máster, por todos los medios proporcionados y todo lo aprendido durante la realización de este trabajo.

En segundo lugar, a Bernardo y Nuria, por ayudarme a darle sentido y forma al trabajo y hacer de jueces del diablo para que todo quedara en su sitio.

Por otro lado, a todos los agricultores que en un primer momento nos dejaron realizar las pruebas en sus fincas, por querer seguir aprendiendo y mejorando y buscar siempre nuevas formas de hacer agricultura. Y en especial, en este caso, a las dos agricultoras de las fincas que finalmente han sido objeto de estudio por todos los datos proporcionados y por ser un gran ejemplo.

A mis padres, agricultores, por enseñarme todo lo que saben y transmitirme lo bonita y necesaria que es esta profesión. A Corín, mi hermana, y resto de mi familia por apoyarme siempre. A mis amigos.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Contextualización del sector de la agricultura.....	1
1.2. Problemática asociada al uso de fertilizantes químicos.....	2
1.3. Importancia de la citricultura	2
1.4. Producto utilizado	3
2. Marco teórico	5
2.1. Rizosfera e interacción planta-organismo-suelo	5
2.2. Rhizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).....	6
2.3. Mecanismo de Acción de las bacterias PGPR.	7
2.4. Mecanismos de acción directos	7
2.4.1. Fijación biológica de nitrógeno (FBN).	8
2.4.2. Solubilización de fósforo	8
2.4.3. Movilización de potasio	9
2.4.4. Movilización de hierro	10
2.4.5. Fitohormonas	10
2.5. Mecanismos de Acción Indirectos.....	11
2.5.1. Producción de sideróforos	11
2.5.2. Producción de enzimas líticas.....	12
3. Objetivos.....	12
4. Materiales y métodos.....	12
4.1. Diseño experimental	12
4.2. Metodología analítica.....	15
4.3. Análisis Estadístico	19
5. Resultados	20
5.1. Finca experimental 1.....	20
5.2. Finca experimental 2.....	22
6. Discusión de los resultados	24
7. Propuesta de mejora	26
8. Conclusiones	28
9. Bibliografía	28
ANEJO I. Análisis estadístico conjunto de los factores muestreo y tratamiento.	35
1.1. Finca Experimental 1.....	35
1.2. Finca experimental 2.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características Físico - Químicas del suelo en la finca experimental 1.	14
Tabla 2. Fechas correspondientes a la toma de muestra de suelo, aplicación del producto y muestra de la recolección en la finca experimental 1.	14
Tabla 3. Relación de abonos utilizados en el manejo de la finca experimental 1.....	15
Tabla 4. Fechas correspondientes a la toma de muestra de suelo, aplicación de producto y muestras de recolección en la finca experimental 2.	15
Tabla 5. Características Físico - químicas del suelo en la finca experimental.....	15
Tabla 6. Relación de abonos utilizados en el manejo de la finca experimental 2.....	15
Tabla 7. Componentes y características del medio general Triptic Soy Agar (TSA)	16
Tabla 8. Componentes y características del medio Jensen.....	16
Tabla 9. Componentes y características del medio Jensen.....	17
Tabla 10. Componentes y características Medio Pikovskayas	17
Tabla 11. Componentes y características Medio Pikovskayas	18
Tabla 12. Componentes y características Medio MM9-CAS	18
Tabla 13. Componentes y características medio Aleksandrow.....	19
Tabla 14. Componentes y Características Leche desnatada	19
Tabla 15. Incremento obtenido tras la aplicación de Micropull en los parámetros: poblaciones generales (PG), poblaciones fijadoras de N (PFN), fijación de N (FN), solubilización de P inorgánico (SPI), mineralización P orgánico (MPO), movilización de K (MK), producción de sideróforos (PS) y producción de proteasas (PP). Finca experimental 1. Valores medios de 3 repeticiones.	21
Tabla 16. Efecto del tratamiento en el calibre y en el peso medio de los frutos en la finca experimental 1, expresadas en medias por mínimos cuadrados y el % de la suma de cuadrados *($p \leq 0,05$) **($p \leq 0,001$).	22
Tabla 17. Incremento obtenido tras la aplicación de Micropull en los parámetros: poblaciones generales (PG), poblaciones fijadoras de N (PFN), fijación de N (FN), solubilización de P inorgánico (SPI), mineralización P orgánico (MPO), movilización de K (MK), producción de sideróforos (PS) y producción de proteasas (PP). Finca experimental 2. Valores medios de 3 repeticiones	23
Tabla 18. Efecto del tratamiento en el calibre y en el peso medio de los frutos en la finca experimental 1, expresadas en medias por mínimos cuadrados y el % de la suma de cuadrados *($p \leq 0,05$).....	24
Tabla 19. Evolución a nivel microbiológico de las capacidades PGP atribuidas al producto MICROPULL en la finca Experimental 1. Valores medios de 6 repeticiones...	36
Tabla 20. Evolución a nivel microbiológico de las capacidades PGP atribuidas al producto MICROPULL en la finca Experimental 2. Valores medios de 6 repeticiones...	39

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Detección de auxinas producidas por <i>Bacillus megaterium</i> , mediante el método Salkowski. Cuanto más intensa es la coloración rosada, mayor es la producción de auxinas.	4
---	---

Ilustración 2. Fijación de nitrógeno detectada por el reactivo de Nessler producido por <i>Bacillus megaterium</i> CECT 9689. Cuanto más intenso es el color oscuro, mayor fijación de nitrógeno se produce.	4
Ilustración 3. Halos de solubilización de fósforo inorgánico (A) y orgánico (B) de <i>Bacillus megaterium</i> CECT 9689 después de solo 7 días de inoculación.	4
Ilustración 4. Halos de solubilización de silicio (A) y potasio (B) de <i>Bacillus megaterium</i> después de solo 7 días de inoculación.	5
Ilustración 5. Halo de solubilización de hierro de <i>Bacillus megaterium</i> después de sólo 7 días de inoculación.	5
Ilustración 6. Fotografía aérea de la finca experimental 1	13
Ilustración 7. Fotografía aérea de la finca experimental 2	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Poblaciones microbianas generales UFC (unidades formadoras de colonias) g ⁻¹ . Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	21
Figura 2.. Poblaciones fijadoras de nitrógeno UFC (unidades formadoras de colonias) g ⁻¹ . Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	21
Figura 3. Fijación de nitrógeno en Medio Jesen comercial a las 48 h, determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	21
Figura 4. Mineralización de fósforo orgánico en mm ² determinada al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	21
Figura 5. Poblaciones microbianas generales UFC (unidades formadoras de colonias) g ⁻¹ . Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	23
Figura 6. Poblaciones fijadoras de nitrógeno UFC (unidades formadoras de colonias) g ⁻¹ . Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	23
Figura 7. Solubilización de fósforo inorgánico (mm ²) determinada al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	24
Figura 8. Poblaciones fijadoras de nitrógeno UFC (unidades formadoras de colonias) g ⁻¹ . Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	37
Figura 9. Poblaciones microbianas generales UFC (unidades formadoras de colonias) g ⁻¹ . Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	37
Figura 10. Mineralización de fósforo orgánico en mm ² determinado al inicio y al final del tratamiento con Micropull. Interacción muestra por tratamiento	37
Figura 11. % Fijación de nitrógeno en Medio Jesen comercial a las 48 h, determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	37
Figura 12. Poblaciones microbianas generales UFC (unidades formadoras de colonias) g ⁻¹ . Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	40
Figura 13. Poblaciones fijadoras de nitrógeno UFC (unidades formadoras de colonias) g ⁻¹ . Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	40
Figura 14. Solubilización de fósforo inorgánico mm ² , determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.	40

1. Introducción

1.1. Contextualización del sector de la agricultura

El sector de la agricultura a lo largo de su historia ha sufrido dos grandes revoluciones. La primera de ellas se produjo con el comienzo de la agricultura hace 10000 años y fue a mediados del siglo XX cuando se produjo la segunda gran revolución, la revolución verde. Con ella, aparecieron las técnicas de monocultivo, tecnologías asociadas al uso de fertilizantes y fitosanitarios, variedades más productivas... etc., que permitieron duplicar las producciones en apenas 20 años a costa de, alimentos de menor calidad nutricional y un alto impacto ambiental. Las Naciones Unidas estima que para el año 2050 la población mundial aumente en 2000 millones de personas, pasando de los 7700 actuales a 9700 en 30 años y aproximadamente, ascienda a 11000 millones para el 2100 ([Naciones Unidas, 2019](#)). Si al aumento de la población, le sumamos el problema asociado a la fragmentación de las tierras, la despoblación y el éxodo rural y los problemas asociados al cambio climático, vemos que el sector de la agricultura se enfrenta a un complejo escenario en el que juega un papel fundamental, por lo que, se necesitan nuevas técnicas que permitan obtener mejores rendimientos, empleando menos recursos ([Martínez-Centeno y Huerta-Sobalvarro, 2018](#)).

Los impactos que generó la revolución verde llevaron a que, en 1992 se planteara en la Conferencia sobre el Medio ambiente y Desarrollo de las Naciones Unidas la idea de una nueva revolución verde. Sin embargo, hoy en día se habla de una revolución agrícola infobiotecnológica en la que se tienen en cuenta las nuevas demandas de la sociedad y los mercados, las cadenas agroalimentarias, la calidad y seguridad de los productos y el uso sostenible de la biodiversidad y los recursos naturales ([Barrera, 2011](#)). De esta manera, en 2015 la Organización de las Naciones Unidas aprobó la agenda 2030 en la que se recogen diecisiete objetivos de desarrollo sostenible que, por primera vez, abarca a todos los países de manera global. Por otro lado, la comisión europea presentó en 2019 una propuesta de pacto verde, destinada a transformar la UE para que sea equitativa y eficiente en el uso de recursos y eliminar así las emisiones de gases de efecto invernadero en el año 2050. Esta es una respuesta europea a la agenda 2030 y los objetivos de desarrollo sostenible planteados por las naciones unidas, con el que se prevé poner en marcha toda una serie de actuaciones. De esta manera, a finales de mayo de 2020, la comisión publicó dos estrategias específicas que reflejan la necesidad y urgencia de cambio en el sector de la agricultura: La estrategia “De la granja a la mesa” y “Biodiversidad de aquí a 2030” ([Martínez, 2020](#)). Los objetivos que marca la estrategia para el 2030 para la producción de alimentos sostenibles son:

- Reducir un 50% el uso y el riesgo de plaguicidas químicos más peligrosos
- Reducir las pérdidas de nutrientes al menos un 50% sin deteriorar la fertilidad del suelo
 - Reducir el uso de fertilizantes al menos un 20% (Acción: Revisión de los reglamentos para facilitar productos fitosanitarios que contengan sustancias activas biológicas (2021) y Plan de acción para la gestión integrada de nutrientes para reducir la contaminación producida por el uso de fertilizantes)
 - Reducir un 50% las ventas de antimicrobianos para animales de granja y de acuicultura
 - Conseguir que, al menos, un 25% de las tierras agrícolas de la UE se dediquen a la agricultura ecológica

1.2. Problemática asociada al uso de fertilizantes químicos

Las nuevas técnicas de cultivo asociadas a la revolución verde permitieron aumentar el rendimiento por hectárea cultivada, disminuir la malnutrición de los países más pobres, así como obtener nuevas variedades más resistentes a las condiciones meteorológicas más desfavorables, plagas o enfermedades que pudieran afectar a la productividad de los cultivos ([Martínez-Centeno y Huerta-Sobalvarro, 2018](#)). Estos resultados se consiguieron gracias a un elevado consumo de fertilizantes químicos, registrado según la Asociación Internacional del Uso de Fertilizantes (IFA, por sus siglas en inglés), mostrando cómo desde 1961 hasta 2015 su uso se incrementó 55 veces, pasando de 31,7 a 183,9 millones de toneladas ([IFA, 2018](#)).

Pese a los grandes avances que dejó la revolución verde en la agricultura, también ha provocado que esta tenga una dependencia directa con el consumo de fertilizantes que no solo encarece los costes, sino que además puede dejar cuerpos de aguas contaminados, suelos agrícolas de baja calidad, salinizados, degradados, con una importante reducción de la población microbiana y necesidad de grandes insumos de agua para producir que dejan de lado a zonas con escasez de dicho recurso ([Roper, 2020](#)). Los beneficios que generan los fertilizantes químicos en los cultivos quedan eclipsados por la contaminación asociada a estos insumos sobre el medio ambiente, la salud humana y al ineficiente aprovechamiento de estos por parte de la planta atribuidas a la volatilidad de ciertos elementos, lixiviación del nitrógeno o emisión de gases a la atmósfera ([Crews y Peoples, 2004](#)).

El escenario actual muestra que aproximadamente el 33% de los suelos están degradados y que el crecimiento de la población demandará un incremento de la producción de alimentos del 60% para el 2050 (FAO, 2015). Para minimizar el impacto generado por las prácticas establecidas hasta ahora, es necesario llevar a la agricultura hacia un enfoque más técnico en el que se conozcan los requerimientos nutricionales de los cultivos, así como la eficiencia de los fertilizantes en aportación de nutrientes y la salud del suelo. Para ello, existen distintas posibilidades tecnológicas como la utilización de fertilizantes orgánicos, basar las dosis de fertilizantes en análisis de suelo y la utilización de microorganismos con capacidad para promover el crecimiento de la planta para disminuir la cantidad de insumos utilizados sin disminuir el rendimiento ([FAO, 2018](#)).

Estos microorganismos son utilizados para la producción de productos biológicos, conocidos como biofertilizantes. El empleo de biofertilizantes empezó en el año 1898 en Wisconsin, USA, y su comercialización fue 32 años después con biofertilizantes a base de *Rhizobium*. Durante las décadas de 1930 y 1940 se empezaron a formular biofertilizantes a base de bacterias diazotróficas de vida libre como *Azotobacter* o la solubilizadora de fosfatos *Bacillus megaterium*. El uso de biofertilizantes es uno de los aspectos más importantes en la agricultura moderna como alternativa a los fertilizantes químicos, que permiten incrementar el rendimiento de los cultivos entre un 17% y un 50%, mejorar la fertilidad del suelo y disminuir la población de microorganismos nocivos para los cultivos ([Aguado-Santacruz et al., 2012](#)).

1.3. Importancia de la citricultura

La citricultura es una práctica imprescindible para la economía española ya que es líder en exportación a nivel mundial y ocupa la sexta posición en producción con 7045 millones de toneladas en la campaña 2020/2021 y más de 300000 ha dedicadas a este cultivo, distribuyéndose principalmente entre la Comunidad Valenciana, Andalucía y Murcia ([Borras, 2021](#)). Entre estas comunidades se concentra 98% de la producción de cítricos a nivel nacional,

con un 54% en la Comunidad Valenciana, Andalucía un 31% del total y Murcia con casi un millón de toneladas, representa el 13% de la producción ([MAPA, 2019](#)).

Actualmente, el sector citrícola se enfrenta a una compleja situación ocasionada por la globalización del mercado. Esta realidad está motivada por diversos factores entre los que se encuentran el abandono de la actividad de explotaciones inferiores a 20 ha, reducidas en un 35%, los bajos precios conseguidos por los productores en las últimas campañas como la de 2018-2019, sumado a un incremento del 70% de los costes de producción durante los últimos 30 años ([Fernández-Zamudio, 2021](#)). Por otro lado, se encuentran los acuerdos que la Unión Europea ha firmado con países terceros como Marruecos cuyos costes de producción son muy bajos, presionando los precios a la baja ([Bautista, 2011](#)) y, la fuerte amenaza de nuevas plagas y enfermedades, consecuencia del cambio climático que acontece. A esto, se le debe sumar el problema de escasez estructural de recursos hídricos convencionales particularmente los que sufre la cuenca hidrográfica del Segura, que obliga a los agricultores a utilizar fuentes no convencionales como la desalación o la reutilización de aguas residuales, la contaminación del Mar menor o zonas vulnerables por contaminación por nitratos.

Es por ello, que la agricultura en general y la citricultura en particular deben buscar nuevas técnicas que les permitan diferenciarse en comercialización y producción, basadas en sistemas de cultivo que busquen conseguir una agricultura sostenible a largo plazo y que traiga con ella beneficios económicos, agronómicos y medioambientales.

1.4. Producto utilizado

Como se ha comentado, el empleo de biofertilizantes se plantea como una solución para hacer frente al problema al que se enfrenta la agricultura actualmente. Para el desarrollo del presente trabajo se ha utilizado el Biofertilizante Micropull, formulado a base de *Bacillus megaterium* CECT 9689 con un contenido mínimo de 10^7 CFU/ml y extracto de algas (*Ascophyllum nodosum*). Micropull es un formulado comercial autorizado como insumo agrario en agricultura ecológica.

La cepa comercial, *Bacillus megaterium*, fue descubierta por primera vez por De bary en el año 1884, descrita por el mismo como “la gran bestia” por ser una de las bacterias más grandes ($4 \times 1,5 \mu\text{m}$) ([Vary et al., 2007](#)). Se trata de una rizobacteria, Gram-positiva, aeróbica, con capacidad para formar esporas que, aumenta su capacidad para resistir una amplia gama de condiciones de estrés ([Nicholson et al., 2022](#)). *Bacillus megaterium*, posee propiedades promotoras del crecimiento vegetal PGPR (por sus siglas en inglés, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), debido a su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico, producir fitohormonas, y solubilizar nutrientes minerales no asimilables, aumentando su disponibilidad para la planta. En concreto, entre las capacidades PGP más importantes de la cepa *Bacillus megaterium* CECT 9689, destacamos las siguientes:

A.- Producción de fitohormonas: *Bacillus megaterium* CECT 9689 produce una concentración muy importante de auxinas, hormonas que inducen el alargamiento del tejido celular vegetal, lo que se traduce en un aumento generalizado del tamaño y porte de la planta. En la fotografía 1 se observa la detección de auxinas producidas por *Bacillus megaterium* mediante el método Salkowski.

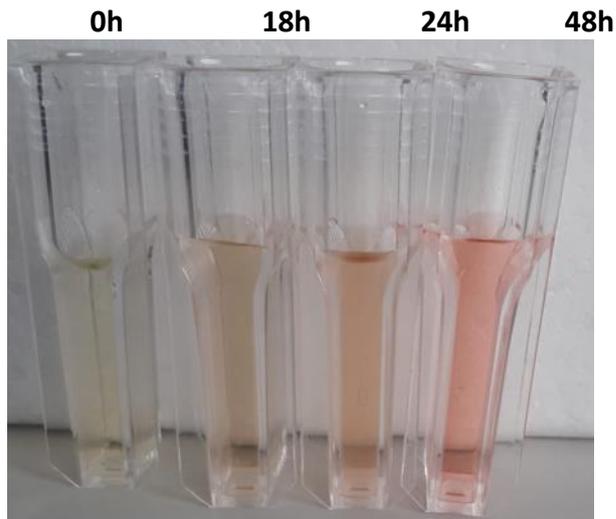


Ilustración 1. Detección de auxinas producidas por *Bacillus megaterium*, mediante el método Salkowski. Cuanto más intensa es la coloración rosada, mayor es la producción de auxinas.

B.- Fijación de nitrógeno: *Bacillus megaterium* CECT 9689 tiene actividad nitrogenasa, enzima capaz de fijar nitrógeno atmosférico proporcionando el amonio necesario para el crecimiento de las plantas. En la fotografía 2 se observa la fijación de nitrógeno detectada por el reactivo de Nessler.



Ilustración 2. Fijación de nitrógeno detectada por el reactivo de Nessler producido por *Bacillus megaterium* CECT 9689. Cuanto más intenso es el color oscuro, mayor fijación de nitrógeno se produce.

C.- Solubilización de P inorgánico y Mineralización de fósforo orgánico: *Bacillus megaterium* CECT 9689, es un gran solubilizador de fósforo, ya sea en estructuras minerales o asociado a materia orgánica, al liberar ácidos orgánicos que desestabilizan la estructura mineral u orgánica, al bajar el pH y por quelación de los cationes adheridos a los grupos fosfato, hacen que el anión fosfato sea accesible para la asimilación de las plantas. En la fotografía 3 se observan los halos de solubilización de fósforo tras 7 días de inoculación.

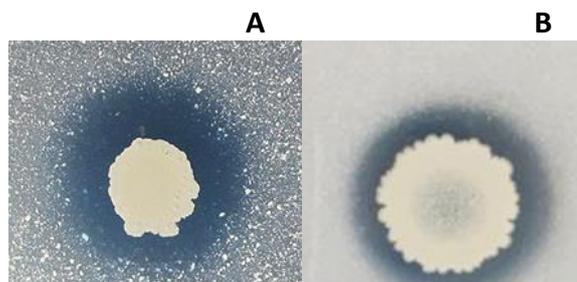


Ilustración 3. Halos de solubilización de fósforo inorgánico (A) y orgánico (B) de *Bacillus megaterium* CECT 9689 después de solo 7 días de inoculación.

D.- Movilización de Potasio: *Bacillus megaterium* CECT 9689 también tiene la capacidad de solubilizar potasio liberando ácidos orgánicos, desestabilizando la estructura mineral al bajar el pH y quelando los cationes de la estructura mineral, permitiendo que el K^+ sea liberado y disponible para la absorción de la planta. En la fotografía 4 se observan los halos de solubilización tras 7 días de inoculación.

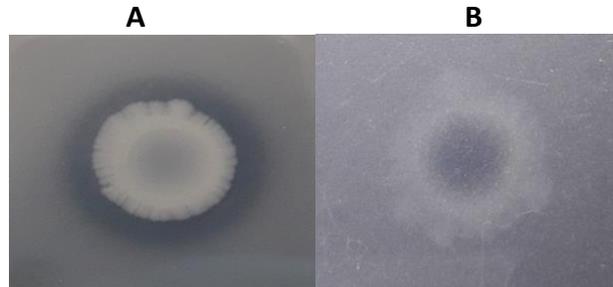


Ilustración 4. Halos de solubilización de silicio (A) y potasio (B) de *Bacillus megaterium* después de solo 7 días de inoculación.

E.- Movilización de hierro: *Bacillus megaterium* CECT 9689 es un gran movilizador de hierro ya que produce y secreta sideróforos, que son compuestos quelantes de hierro que se unen al Fe^{+3} insoluble y no pueden ser asimilados por organismos vegetales. *Bacillus megaterium* CECT9689 transporta estos sideróforos a su interior, produciendo la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} que finalmente se libera al exterior para ser asimilado por las plantas. En la fotografía 5 se observa el halo de solubilización de hierro tras 7 días de inoculación.

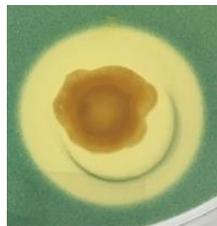


Ilustración 5. Halo de solubilización de hierro de *Bacillus megaterium* después de sólo 7 días de inoculación.

2. Marco teórico

2.1. Rizosfera e interacción planta-organismo-suelo

En la agricultura tradicional intensiva, la principal función que se le otorgaba al suelo era servir de soporte para la vegetación e incrementar la productividad de los cultivos. Para ello, se recurría a la utilización de una gran cantidad de insumos y a un uso excesivo de fertilizantes y herbicidas. Este uso desmesurado de productos químicos ha provocado un desajuste en el equilibrio microbiano naturalmente establecido, reduciendo las interacciones entre la planta y los microorganismos, además de afectar a la fertilidad del suelo y contaminar el medio ambiente.

La parte del suelo donde se producen las interacciones planta-microorganismo se denomina rizosfera, definida como un volumen de suelo influenciado por las raíces o en asociación con ellas y el material producido por las plantas ([Hinsinge et al., 2005](#)). Está considerada como un ecosistema complejo y único en el que intervienen tres componentes: planta, suelo y microorganismos ([García-Seco, 2017](#)). En la rizosfera se desarrolla un hábitat en el que coexisten numerosas formas de vida donde se encuentra un gran número de organismos con diferentes tamaños (macro y microorganismos) y funciones.

Los microorganismos que se encuentran en el suelo pertenecen a seis grupos distintos: nematodos, protozoos, algas, hongos, actinomicetos y bacterias. De estos, las bacterias son el grupo más numeroso, llegando a contener un suelo sano 10^9 de células por gramo de suelo ([Torsvik y Ovreas, 2002](#)). Sin embargo, en un suelo estresado este número se puede ver reducido a 10^4 células por gramo de suelo ([Timmus et al., 2011](#)).

Las relaciones que se establecen en la interfase raíz-suelo pueden ser beneficiosas, neutras o perjudiciales para las plantas ([Lynch, 1990](#)). La respuesta, está condicionada por las condiciones del suelo y las prácticas de manejo que, a su vez, muestran una influencia directa con la actividad microbiana de la rizosfera ([Glick et al., 1999](#)). Realizando prácticas respetuosas con el suelo, las relaciones que se establecen entre la planta y los microorganismos son beneficiosas para ambos. Las plantas exudan una gran variedad de compuestos orgánicos que sirven como fuente de energía para el desarrollo y crecimiento de los organismos, mientras que, los microorganismos ofrecen numerosos beneficios como mejorar el vigor, la tolerancia al estrés y la resistencia enfermedades.

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios sobre las bacterias presentes en la rizosfera y los beneficios que reportan a las plantas. En el año 1978, Joseph Kloepper y Milton Schoroth describieron por primera vez a un grupo de bacterias que se desarrolla en el ecosistema de la rizosfera y que estimulan el crecimiento de las plantas como PGPR. Estas bacterias representan del 2 al 5% de las bacterias rizosféricas ([Jha y Sarai, 2015](#)) y son capaces de colonizar el sistema radical de las plantas para mejorar o favorecer su crecimiento y rendimiento ([Berendsen et al., 2012](#)).

Las principales funciones de estas bacterias son: (1) sintetizar compuestos para las plantas ([Dobbelaere et al., 2003](#); [Zahir et al., 2004](#)), (2) facilitar la toma de nutrientes del suelo ([Lucas et al., 2004](#); [Çakmakçi et al., 2006](#)) y (3) disminuir o prevenir las enfermedades causadas por patógenos ([Guo et al., 2004](#); [Jetiyanon y Kloepper., 2002](#); [Raj et al., 2003](#); [SaravanaKumar et al., 2006](#)).

2.2. Rhizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

A lo largo de la historia de la agricultura, la intensificación progresiva de los sistemas de cultivo ha generado una gran dependencia por parte de los agricultores hacia los productos que aumentan la fertilidad del suelo como principal estrategia para incrementar los rendimientos de los cultivos. Sin embargo, del total de los fertilizantes aplicados, únicamente de un 10 a un 40% es asimilado ([Bhardwaj et al., 2014](#)), así también, el uso repetido de fertilizantes sintéticos provoca en el suelo una pérdida de fertilidad, obligando a los productores a incrementar su uso para mantener las producciones. Teniendo en cuenta el incremento de costes de producción que conlleva y los impactos ambientales que los fertilizantes sintéticos causan ([Cotler et al., 2016](#)), surge a principios de 1990 la necesidad de estudiar otras alternativas de fertilización que permitan mantener la producción de los sistemas con una menor dependencia de insumos

contaminantes. De esta manera, el uso de microorganismos que poseen capacidades biofertilizantes abre la puerta a nuevas prácticas innovadoras con las que se pretende sustituir de manera parcial o completa la aplicación de fertilizantes sintéticos ([Mishra y Dash, 2014](#)).

Las PGPB son un grupo heterogéneo de bacterias unicelulares y procariotas que pueden mejorar o incrementar el crecimiento y la productividad vegetal ([Bashan et al, 1998](#)). Como se ha comentado, las PGPB otorgan a la planta numerosos beneficios entre los que caben destacar la solubilización del fósforo, la producción de hormonas que promueven el crecimiento, la fijación biológica del nitrógeno y un efecto biocontrol a partir de la inducción de resistencia a plagas y enfermedades ([Schroth y Becker, 1990](#); [Kloepper, 1993](#)). No obstante, la concentración de este tipo de bacterias en los suelos agrícolas no es lo suficientemente elevada como para poder competir con las bacterias ya establecidas. Las condiciones del suelo como la temperatura, estructura, concentración de sales y/o especies vegetales presentes, condicionan tanto el número como los géneros de bacterias que allí se establecen ([Glick et al., 1999](#)). Los géneros de bacterias más conocidos y utilizados para la agricultura son *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* y *Pseudomonas* ([Parray et al., 2016](#)).

En función de las relaciones que establecen con las plantas, las bacterias se pueden clasificar como de vida libre, endófitas y endosimbiontes ([Khan, 2005](#)). Las conocidas como de vida libre pueden vivir de forma natural en el suelo sin crear interacciones con la planta ([Gray y Smith, 2005](#)). Las bacterias endófitas, son capaces de colonizar el interior de la planta (raíz, tallo...) y sobrevivir, en función de la especie, desde minutos hasta años. Por último, las endosimbiontes, colonizan la superficie de la planta creando estructuras especializadas, generalmente nódulos, para fijar nutrientes. Dentro de estas, las más conocidas son las del género *Rhizobium* por producir nódulos en plantas leguminosas ([Glick, 2012](#)).

2.3. Mecanismo de Acción de las bacterias PGPR.

A pesar de las diferencias que muestran las bacterias tanto en género como por las relaciones que establecen con las plantas, los productos elaborados a base de bacterias PGPR se caracterizan por poseer los mismos mecanismos de acción, creando complejas interacciones entre las plantas y los microorganismos que otorgan beneficios a las plantas, de manera directa o indirecta. Cuando de manera directa provocan beneficios para las plantas es desencadenando en ellas un efecto similar al de un fertilizante y/o un estimulante, es decir, produciendo hormonas y mejorando la toma de agua y nutrientes, principalmente. Por otro lado, estas bacterias también tienen un efecto fitosanitario, ya que de manera indirecta mejora la salud de las plantas gracias a que reducen los daños causados por patógenos, activan mecanismos de defensa, producen antibióticos, etc. ([Glick, 2012](#)).

2.4. Mecanismos de acción directos

Los distintos mecanismos por los cuales los biofertilizantes de manera directa mejoran el crecimiento de las plantas son la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo y potasio y el incremento de la asimilación de hierro. Por otro lado, los biofertilizantes formulados con bacterias PGPR presentan también acción bioestimulante mejorando el rendimiento, mediante la liberación de hormonas o modificando la estructura y superficie de la raíz.

2.4.1. Fijación biológica de nitrógeno (FBN).

El nitrógeno molecular -N₂- está ampliamente distribuido en la naturaleza, pero es en la atmósfera donde se encuentra la mayor reserva biológica ocupando aproximadamente el 78% del total ([Mayz, 2004](#)). No obstante, en esta forma, la molécula es prácticamente inerte por su triple enlace pudiendo ser aprovechada únicamente por microorganismos muy especializados como algas, bacterias y actinomicetos ([Mayz-Figueroa, 2004](#)). La gran mayoría de organismos son incapaces de metabolizar el nitrógeno, por lo que tiene que ser reducido y fijado a la forma de ion amonio (NH₄⁺) o los iones nitrito (NO₂⁻) o nitrato (NO₃⁻), absorbibles por la planta.

Una de las características más interesantes de las bacterias promotoras del crecimiento es que son capaces de reducir u oxidar el nitrógeno molecular a formas admisibles para las plantas a través de un proceso conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno. Según un estudio realizado por Oberson y colaboradores en 2013, existen dos grupos de cepas bacterianas responsables de producir la fijación de nitrógeno. Las bacterias simbióticas asociadas a leguminosas que infectan la raíz produciendo nódulos, dentro de estas, el género *Rhizobium* ha sido ampliamente estudiado por su capacidad para crear interacciones simbióticas a partir de la formación de nódulos con plantas leguminosas, donde fijan el nitrógeno y lo transforman a amonio, llegando a fijar 200 Kg N₂ ha⁻¹año⁻¹ ([Supanjani et al., 2006](#)). El segundo grupo corresponde a las bacterias diazótroficas que viven de forma libre en el suelo, son fijadoras de nitrógeno con un alto potencial como biofertilizante y promotoras del crecimiento. Se estima que este grupo es capaz de fijar entre 1 y 10 Kg de N₂ ha⁻¹ año⁻¹ en ambientes enriquecidos del suelo ([Robertson y Groffman, 2013](#)).

Una propiedad común de las bacterias encargadas de fijar el nitrógeno que incluye tanto a las simbióticas como las de vida libre (diazótroficas), es que cuentan con un complejo enzimático denominado nitrogenasa, encargado de llevar a cabo este proceso. Para romper el triple enlace entre los dos átomos de N₂ es necesario una gran cantidad de energía en forma de ATP, que los microorganismos obtienen de la fotosíntesis realizada por la planta. La nitrogenasa está formada por dos componentes: El primero de ellos (Fierro-Molibdeno proteína o dinitrogenasa) encargado de romper el triple enlace y reducir el N₂ a NH₃, mientras que, el segundo componente (Fierro proteína o ditrogenasa reductasa) tiene como objetivo transferir al primer componente la energía que requiere para llevar a cabo la reducción ([Mayz, 2004](#)) y transformarlo en otros compuestos nitrogenados útiles para las plantas como NH₄⁺ o NO₃⁻.

Diversos estudios han aislado diversas cepas bacterianas con potencial para fijar el nitrógeno, entre la que se encuentran: *Pseudomonas fluorescens*, *Beijerinckia sp*, *Azoascur sp*, *Azotobacter sp*. ([Guzmán et al., 2012](#)), *Burkholderia unamae* ([Caballero-Mellado et al., 2004](#)), *G. diazotrophicus* ([Sevilla et al., 2001](#)), *Herbaspirillum sp.* y *Azospirillum sp.* ([Fibach-Paldi et al., 2012](#)) y *Bacillus sp* ([Tejera et al., 2013](#)).

2.4.2. Solubilización de fósforo

Detrás del nitrógeno, el fósforo es el segundo macronutriente de mayor importancia para el crecimiento de las plantas ([Ehrlich, 1990](#)). Pese a que los suelos agrícolas contienen grandes cantidades de fósforo, que oscilan entre 400-1.200 mg de P kg⁻¹ de suelo, gran parte no está disponible para las plantas ya que se encuentra en forma insoluble ([Fernández y Novo,](#)

[1988](#)). Las plantas absorben este mineral en estado soluble como fosfato mono (H_2PO_4^-) y dibásico (HPO_4^{2-}). La concentración de fósforo soluble en la solución del suelo es muy pequeña, al nivel de 1ppm ([Goldstein, 1994](#)) y de manera general, el 75% del fósforo aplicado en fertilizantes precipita a formas insolubles ([Goldstein, 1986](#)).

Una particularidad relevante de las bacterias PGPCa es que pueden transformar el fósforo mineral insoluble en soluble gracias a un proceso denominado Solubilización del fósforo mineral (MPS, por las siglas en inglés), permitiendo incrementar la cantidad de fosforo asimilable para las plantas ([Gyaneshwar et al., 1999](#)). El mecanismo a través del cual las PGPR pueden liberar el fósforo inmovilizado del suelo es produciendo ácidos orgánicos de bajo peso molecular ([Glick, 2012](#)), que resultan del metabolismo de compuestos con alto peso molecular como carbohidratos, péptidos y lípidos ([Baziramakenqa et al., 1995](#); [Paredes et al., 2010](#)), producidos en el periplasma de las bacterias gram negativas.

Existen numerosos ácidos orgánicos involucrados en el proceso de la solubilización del fósforo, no obstante, el ácido glucónico es el más frecuente y producido por numerosas cepas como *Pseudomonas sp*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia* y *Burkholderia cepacia* ([Rodríguez y Fraqa, 1999](#)). Otro ácido de gran interés es el ácido 2-cetaglucónico, sintetizado por cepas de *Rhizobium leguminosarum* ([Halder et al., 1990](#)), *Rhizobium melioli* ([Halder et al., 1991](#)) y *Bacillus firmus* ([Banik y Dey., 1982](#)). Por otro lado, *Bacillus megaterium* puede liberar gran variedad de ácidos orgánicos como succínico, cítrico, láctico o acético para la solubilización de fosfatos ([Chen et al., 2006](#)). De la liberación de estos ácidos, se produce una bajada en el pH del medio, de manera que, los protones compiten con el fósforo por los sitios de adsorción. Al mismo tiempo, los ácidos orgánicos crean complejos con ciertos iones metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+}) que se asocian a las formas insolubles del fósforo, dejándolo disponible ([Guzman, 2011](#)).

La mineralización de P orgánico insoluble, a diferencia del mineral, es un proceso controlado por la excreción de enzimas extracelulares como la fosfatasa ([Güqi et a, 1991](#); [Rodríguez y Fraqa, 1999](#)) o fitasa ([Richardson y Hadobas, 1997](#)). Así, por ejemplo, fitasas extracelulares cuya reacción permite liberar el grupo fosfato del fitato, dejándolo disponible para la planta, han sido descritas en algunas cepas del género *Bacillus* ([Jeyanthi, 2013](#)).

2.4.3. Movilización de potasio

Junto con el nitrógeno y el fósforo, el potasio corresponde a uno de los macroelementos imprescindibles para el desarrollo y crecimiento de las plantas, actuando como activador de enzimas y regulador osmótico. Las plantas obtienen el potasio de la solución del suelo cuya concentración oscila entre el 0,1 y 0,5%, mientras que, alrededor de un 95% está en forma no asimilable, formando parte de las estructuras y redes cristalinas de los elementos primarios. La lixiviación, la escorrentía y la erosión del suelo han provocado un sucesivo agotamiento del potasio disponible.

El efecto fertilizante de las bacterias PGPR, les permite solubilizar el potasio que se encuentra en los minerales del suelo hacia la solución, empleando el mismo mecanismo utilizado para la solubilización del fósforo: (1) disminución del pH (2) mejora de la quelación de cationes unidos a K y (3) acidólisis de la zona circundante de microorganismos. Para producir una disminución de pH del medio es necesario la liberación de ácidos orgánicos y protones por los microorganismos solubilizadores de potasio ([Zarjani et al., 2013](#); [Parmar y Sindhu, 2013](#)). A partir de esta acidólisis, se puede disolver directamente el potasio de los minerales debido a que el K es dinámico en el suelo, tiene baja carga y se puede liberar lentamente al complejo ([Römheld y Kirkby, 2010](#)). En función de los organismos presentes en el medio, se producen diversos tipos

de ácidos orgánicos ([Sheng et al., 2008](#)), de los cuales, los más abundantes son: succínico, cítrico, glucónico y oxálico ([Menna et al., 2014](#)). Se han reportado diferentes cepas de géneros como *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Bacillus* ([Sheng et al., 2008](#)) como bacterias que solubilizan K mineral insoluble, aumentando los rendimientos de los cultivos.

2.4.4. Movilización de hierro

El hierro es un micronutriente esencial para las plantas ([Morrissey y Guerinot., 2009](#)) y el cuarto elemento más abundante en la tierra. A pesar de esto, la forma predominante en la que el hierro se encuentra en el suelo, el ion Fe^{3+} , no es asimilable para las plantas ni para los microorganismos ([Colombo et al. 2014](#)). Esto hace que en la rizosfera el nivel de hierro asimilable sea muy bajo y se generen competencias entre plantas, microorganismos y patógenos para obtenerlo y cubrir sus necesidades.

Las plantas han desarrollado dos estrategias para aumentar la absorción de hierro: liberar, por un lado, compuestos orgánicos capaces de quelar el hierro, reducirlo y hacerlo soluble para ser absorbido por un sistema enzimático presente en la membrana celular de la planta gracias a transportadores de hierro como FRO Y FIT ([Morrissey y Guerinot, 2009; Conte y Walter, 2011](#)). La segunda estrategia consiste en absorber un complejo formado por un compuesto orgánico y el hierro Fe^{3+} para ser reducido dentro de la planta y absorbido fácilmente ([Ahmed y Holmström, 2014](#)). Las bacterias PGPR, en condiciones limitantes de hierro en el suelo, tienen la capacidad de sintetizar moléculas de bajo peso molecular, denominadas sideróforos, con una alta afinidad por el Fe^{3+} que actúan como quelantes para secuestrarlo y reducirlo a Fe^{2+} , forma más asimilable para ellos mismos ([Aguado-Santacruz et al., 2012](#)). Algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Flavobacterium* se describen como productoras de sideróforos.

2.4.5 Fitohormonas

Las fitohormonas son moléculas que a bajas concentraciones regulan la expresión de los genes implicados en el crecimiento y desarrollo vegetal. Vessey, 2003, concluyó que diversas cepas de bacterias PGP son capaces de promover el crecimiento vegetal sintetizando hormonas que promueven el crecimiento de las raíces, de manera que, la planta mejora la toma de agua y nutrientes. Otro aspecto importante de esta característica de las PGPR es que, bajo condiciones estresantes, la planta puede minorar los efectos y adaptarse mejor a ellos. Algunos de los grupos de hormonas que sintetizan incluyen auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno y ácido jasmónico ([Pereira et al., 2016; Eqamberdieva et al., 2017](#)).

Las auxinas son un grupo de fitohormonas que intervienen en la división, crecimiento y diferenciación de las células. El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más conocida y producida por las rizobacterias ([Ali, 2015](#)) así, se estima que el 80% de las bacterias aisladas producen AIA ([Patten y Glick., 1996](#)). El AIA que es liberado como producto de su metabolismo por las bacterias a la rizosfera, afecta al desarrollo radicular; aumentando su tamaño, peso, ramificación y área de superficie. Esto, mejora la capacidad de las raíces para explorar el suelo en busca de nutrientes, mejorando la nutrición y desarrollo de la planta. Las bacterias PGPR tienen la capacidad de producir giberelinas, hormona implicada en procesos relacionados con el crecimiento como la germinación, floración, fructificación y regulación del estrés ([Pereira et al., 2016](#)). Así mismo, las citoquininas son un grupo de hormonas que participan en la división celular

y la diferenciación de tejidos. Se ha visto que, algunos patógenos son capaces de sintetizar citoquininas. Sin embargo, el nivel de producción de citoquininas de las PGPR es menor respecto al de los patógenos, de manera que, el efecto que tienen sobre el crecimiento de las plantas es estimulador mientras que el efecto de las citoquininas producidas por los patógenos es inhibitorio ([Glick, 2012](#)).

El etileno (ET) actúa a bajas concentraciones en todas las etapas del ciclo biológico de la planta, o bien, como respuesta a diferentes estreses bióticos y abióticos ([Zacarias y Lafuente, 2008](#)). Como respuesta al estrés, las plantas, crean mecanismos de defensa regulados por el etileno, proceso que requiere un gran gasto de energía. Las bacterias PGPR son capaces de reducir los efectos causados por el estrés disminuyendo la concentración de etileno, gracias a la capacidad que tienen de producir una enzima denominada 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa). La ACC desaminasa hidroliza a ACC sintasa, precursor directo del etileno, dando lugar a una fuente de carbono (α -cetobutirato) y nitrógeno (amonio) que puede ser utilizado por las plantas ([Shen et al., 2012](#)). De esta manera, las PGPR que colonizan las raíces de las plantas y sintetizan ACC desaminasa regulan la concentración de etileno en las plantas, evitando que este tenga un efecto inhibitorio ([Glick et al., 1999](#)). Esta característica de las bacterias también puede ser considerada como un efecto indirecto, ya que evita que la planta gaste energía de manera innecesaria.

Las cepas bacterianas capaces de producir ACC desaminasa están clasificadas dentro un amplio rango de géneros como; *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas* y *Sinorhizobium* ([Molina et al., 2015](#)).

2.5. Mecanismos de Acción Indirectos

Otra acción que llevan a cabo los productos elaborados a partir de bacterias PGPR es actuar como agentes bioinductores o de biocontrol, disminuyendo de manera indirecta los efectos causados por los patógenos y permitiendo a las plantas mejorar su crecimiento y rendimiento ([Hernández y Charlloux, 2001](#); [Glick et al., 1999](#)). Para llevar a cabo esta acción, las bacterias producen antibióticos, enzimas líticas, compuestos volátiles, sideróforos, que inducen resistencia y compiten con los patógenos con el fin de impedir que colonicen a las plantas ([Beneduzi et al., 2012](#)).

2.5.1. Producción de sideróforos

La producción de sideróforos es también una estrategia de las PGPR para mejorar el desarrollo de la planta de manera indirecta. Previamente, se había hablado de los sideróforos como moléculas de pequeño tamaño producidas por microorganismos en condiciones limitantes de hierro para incrementar su entrada a la célula microbiana ([Saha et al., 2013](#)). Algunos géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* han sido caracterizados como agentes de biocontrol contra patógenos en condiciones insuficientes de Fe debido a que producen sideróforos, cuya función es quelar el Fe, privando a los patógenos de este elemento para evitar que proliferen y colonicen la raíz ([Solanki et al., 2013](#)).

2.5.2. Producción de enzimas líticas

Los microorganismos tienen capacidad de actuar como agente de biocontrol, disminuyendo los daños causados por enfermedades y por actividad antagonista hacia los patógenos. Algunos, entre los que se encuentran las bacterias PGPR, son capaces de actuar sobre otros microorganismos que actúan como patógenos sobre el cultivo, provocando pérdidas económicas en los cultivos, produciendo enzimas ([Tejera-Hernández et al., 2011](#)). Enzimas como β -glucanasas, celulasas, dehidrogenasas, exo y endo-poligalacturonasas, fosfatasa, hialuronidasas, lipasas, pectinolasas, proteasas y quitinasas, actúan principalmente contra los hongos degradando sus paredes celulares ([Molina-Romero et al., 2015](#)).

3. Objetivos

El objetivo del presente Trabajo Final de Máster es evaluar el efecto de la adición de un formulado biofertilizante (Micropull) a base de una cepa comercial de amplio espectro de acción PGP, *Bacillus megaterium* CECT 9689, aplicado mediante fertirrigación en el cultivo de los cítricos. Para ello, se estudiará la evolución en población y actividad del microbiota presente en el suelo.

Las propiedades PGP atribuibles a la cepa en cuestión y cuya eficacia se determina son: fijación del N atmosférico, solubilización del fósforo, movilización del potasio, producción de sideróforos y proteasas. Adicionalmente se determina la respuesta productiva en las parcelas tratadas.

4. Materiales y métodos

4.1. Diseño experimental

El proyecto se ha desarrollado en dos explotaciones cítricas situadas al sur de la provincia de Alicante, con diferentes características en cuanto a sistemas de producción (ecológico y reconversión a ecológico), variedades y condiciones edafológicas se refiere.

- Finca experimental 1:

Se trata de una explotación de cítricos situada en el municipio de Crevillente. Plantada en el año 2012, cuenta con una superficie total de 30 ha, con tres variedades de mandarina clementina: 'Clemenrubí', 'Orogros' y 'Oronules'. El tratamiento experimental se ha realizado sobre la variedad 'Clemenrubí' injertada sobre *Citrus macrophylla*, dividida en dos sectores de la misma superficie (3,85 ha), de los cuales, uno se ha dejado como testigo (Ilustración 6). El cultivo, se encuentra bajo malla y en el segundo año de reconversión a producción ecológica.

En cuanto al manejo, la plantación cuenta con 4 goteros de 4L h⁻¹ por árbol y la fertilización se realiza a través de abonos orgánicos con registro en agricultura ecológica, tabla 3. Durante el año 2021 los Kg de N-P-K aplicados por hectárea a ambas parcelas de 'Clemenrubí', tratada y testigo, fueron las siguientes: 78 N ha⁻¹, 16 P ha⁻¹, 88 K ha⁻¹.

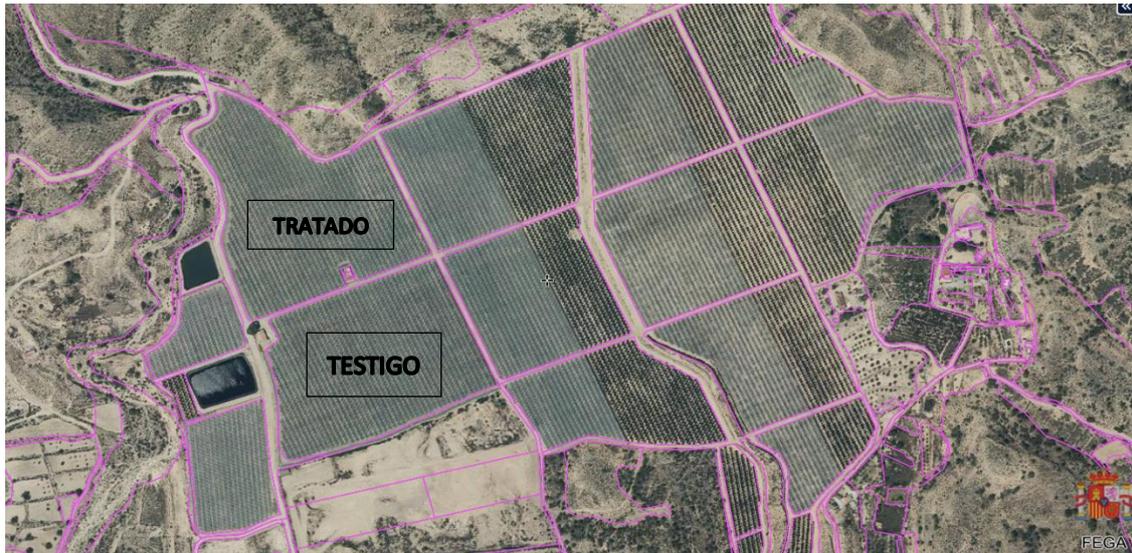


Ilustración 6. Fotografía aérea de la finca experimental 1

- Finca experimental 2:

Esta finca se localiza en el término municipal de Albatera, con una superficie de 6 ha. Se trata de una finca de naranja, variedad ‘Navelina’ sobre *Citrus macrophylla* plantada en el año 2006. La finca está dividida en dos sectores, el sector tratado tiene una superficie cultivada de 3 ha, mientras que el sector testigo cuenta con 2,3 ha (Ilustración 7).

Se trata de un cultivo en producción ecológica que cuenta con 4 goteros de 4L h⁻¹ por árbol. La fertilización se realiza con abonos orgánicos que tienen registro en agricultura ecológica, tabla 6. Durante el año 2021, los kg de N-P-K aplicados por hectárea a ambas parcelas experimentales fueron: 155 N ha⁻¹, 0 P ha⁻¹, 192 K ha⁻¹. A diferencia de la finca experimental 1, en esta explotación no se realiza aportación de fósforo.



Ilustración 7. Fotografía aérea de la finca experimental 2

Cada una de las explotaciones se ha dividido de manera que, dispongan de 3 parcelas tratadas y 3 como testigo. En cada una de estas parcelas tratadas, se ha llevado a cabo el mismo protocolo de tratamientos: 3 aplicaciones de Micropull a 2 L ha⁻¹ mediante fertirrigación en los meses de febrero, marzo y abril, coincidiendo con el inicio de la brotación y espaciando las aplicaciones 3-4 semanas (Tabla 2 y 5).

Para realizar los análisis físico-químico y microbiológicos, se han realizado dos muestreos, tomado muestras de rizosfera de todas las parcelas, tratadas y testigo. La primera, antes de la aportación del biofertilizante (Muestreo inicial) y la segunda, 3-4 semanas después de la última aplicación (Muestreo final), tiempo estimado para que el microorganismo inoculado germine, colonice la rizosfera y realice su función PGP. Los muestreos se han realizado siempre en los mismos puntos para estudiar la evolución microbiológica del suelo en puntos concretos, eliminando variabilidad espacial (Tabla 4 y 6). De cada una de las muestras se ha realizado, a nivel físico- químico una determinación de los siguientes parámetros: textura, contenido en materia orgánica, conductividad eléctrica (C.E.), pH y contenido en caliza activa (Tabla 1 y 4). A nivel microbiológico, se han realizado recuentos microbianos en medios específicos y ensayos de actividad PGP de los suelos que permitan ver la evolución a lo largo del tiempo de la capacidad de fijación de N, capacidad de solubilización de P, capacidad de movilización de K y capacidad de producción de sideróforos y proteasas (Tabla 15 y 17).

Para obtener los datos relativos a calibre y peso de fruto, en la época de recolección (Tabla 2 y 5), se tomó de cada una de las parcelas experimentales, el árbol ubicado en el mismo punto donde se realizó el muestreo, y se cogieron un total de 100 frutos de forma aleatoria. Una vez recolectada la fruta, se pudo obtener el rendimiento final (kg ha⁻¹) obtenido tanto en las parcelas tratadas como en las testigos; este dato ha sido proporcionado por los agricultores a partir de los albaranes de compraventa de la fruta.

Tabla 1. Características Físico - Químicas del suelo en la finca experimental 1.

TEXTURA	C.E	M.O	CALIZA ACTIVA	PH
Franco - Arcillosa	0,71	<0,5 %	14 %	8,4

Tabla 2. Fechas correspondientes a la toma de muestra de suelo, aplicación del producto y muestra de la recolección en la finca experimental 1.

Primera toma de muestra	11-02-2021
Primera aplicación de Micropull	28-02-2021
Segunda aplicación de Micropull	25-03-2021
Tercera aplicación de Micropull	28-04-2021
Segunda toma de muestra	27-05-2021
Toma de muestras recolección	21-10-2021

Tabla 3. Relación de abonos utilizados en el manejo de la finca experimental 1.

ABONO	COMPOSICIÓN				DOSIS		APORTE (kg ha ⁻¹)			
	N	P	K	Ca	L ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	N	P	K	Ca
BROTOLIM ECO K-MO	2,2		4		100	120	2,64		4,80	
BROTOLIM ECO N-AA	6				923	1107,60	66,46			
HAIFA SOP BIO (kg)			51			117,80			60,08	
TERRAPLUS 2-4-6	2	4	6		340	380,80	7,62	15,23	22,85	
OURPIZCA				6	600	666				39,96

Tabla 4. Fechas correspondientes a la toma de muestra de suelo, aplicación de producto y muestras de recolección en la finca experimental 2.

Primera toma de muestra	11-02-2021
Primera aplicación de Micropull	23-02-2021
Segunda aplicación de Micropull	23-03-2021
Tercera aplicación de Micropull	25-04-2021
Segunda toma de muestra	27-05-2021
Toma de muestras recolección	24-09-2021

Tabla 5. Características Físico - químicas del suelo en la finca experimental

TEXTURA	C.E	M.O	CALIZA ACTIVA	PH
Franco - Arenosa	0,91	1,35 %	9 %	8,1

Tabla 6. Relación de abonos utilizados en el manejo de la finca experimental 2.

ABONO	COMPOSICIÓN				DOSIS		APORTE (kg ha ⁻¹)			
	N	P	K	Ca	L ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	N	P	K	Ca
BROTOLIM ECO K-MO	2,2		4		1517	1820,40	40,05		72,82	
BROTOLIM ECO N-AA	6				1551	1861,20	111,67			
HAIFA SOP BIO (kg)			51			216,00			110,16	
OURSOL 2-4	2		4		259	313,39	6,27		12,54	
OURPIZCA				6	455	505,05				30,30

4.2. Metodología analítica

Para el procesado de las muestras de suelo, una vez recibidas en el laboratorio se etiquetan convenientemente y se preservan a 4°C, previo tamizado con un tamiz de 6 mm de luz, para mantener las propiedades microbiológicas y enzimáticas. Como se ha comentado, se han realizado dos tipos de análisis para cada una de las muestras:

- **Análisis fisicoquímico:** Una muestra homogeneizada de cada explotación se envía a un laboratorio acreditado de suelos para la determinación de la textura (densímetro de Bouyoucos USDA), pH (potenciometría en extracto 1:2:5 a 25°C), conductividad eléctrica, (conductimetría en extracto 1:5 a 25°C), contenido en materia orgánica (materia orgánica oxidable por volumetría) y caliza activa.

- **Análisis microbianos:** Los recuentos microbianos se realizaron en cada una de las muestras recogidas (1 por parcela experimental) y para los dos tiempos de muestreo (antes y después de las aplicaciones de Micropull) tanto para la tesis tratada como para la tesis testigo

Para realizar tanto los recuentos como las determinaciones enzimáticas, se parte de una solución de suelo preparada según el siguiente protocolo:

- 1.- En primer lugar, se cogen 5 g de cada suelo y son disueltos en 50 ml de medio Jensen comercial (sin fuente de nitrógeno).
- 2.- A continuación, la solución se agita a 180 rpm durante 20 minutos en medio Jensen para permitir una liberación del microbiota del suelo al medio de la suspensión.
- 3.- Una vez finalizada la agitación, se realiza una agitación final con vórtex durante 30 segundos para liberar completamente las poblaciones microbianas, antes de su plaqueo en los medios de cultivo.

Una vez liberadas las poblaciones microbianas, los recuentos microbianos se han realizado a partir de diluciones seriadas de la solución de suelo en 2 medios diferentes. El primero de los medios, medio general Tryptic Soy Agar, (Tabla 7) es utilizado para realizar un recuento de la población general de microorganismos presentes en la muestra de suelo, para ambos tiempos de muestro. El segundo (Tabla 8), el medio Jensen, es un medio selectivo para hacer el recuento de las poblaciones microbianas fijadoras de nitrógeno.

1.- Medio general Tryptic Soy Agar (TSA)

Tabla 7. Componentes y características del medio general Tryptic Soy Agar (TSA)

Medio TSA	pH 7
Componentes	Concentración (g L ⁻¹)
Triptona	15
Peptona de soja	5
NaCl	5
Agar	15

2.- Medio selectivo para fijadores de nitrógeno (Jensen comercial)

Tabla 8. Componentes y características del medio Jensen.

Medio Jensen	pH 7
Componentes	Concentración (g L ⁻¹)
Sacarosa	20
K ₂ HPO ₄	1
NaCl	0,5
Na ₂ MoO ₄	0,005
FeSO ₄	0,1
MgSO ₄	0,5
CaCO ₃	2
Agar	15

Para estudiar la evolución de las capacidades PGP de los suelos se realiza un estudio enzimático. Las capacidades PGP estudiadas están relacionadas con las descritas para la cepa contenida en el producto de ensayo. Así, partiendo de la solución de suelo descrita se inoculan por duplicado placas preparadas con medios específicos para cada PGP a testar. Los protocolos seguidos para cada PGP se resumen a continuación:

A.- Fijación de Nitrógeno: Durante 48h a 30°C a 180 rpm, se incuban 45 ml de la suspensión de suelo realizada en Medio Jensen comercial (Tabla 9), carente de N y donde sólo las poblaciones fijadoras de nitrógeno podrán crecer si fijan dicho elemento. Se toman alícuotas a 0 y 48 h de incubación para cuantificar el amonio fijado por colorimetría, de forma que se tendrá la fijación inicial de nitrógeno y la fijación a las 48 h para cada muestra obtenida. Para ello, a cada alícuota de 4 ml se le añade 80 µl EDTA (500g/L), 20 mg de NaOH y 130 µl del reactivo de Nessler, se incuban a 30°C durante 20 minutos y se mide su absorbancia a 420 nm, comparando dicho valor con una recta patrón previamente calibrado con un gradiente de concentraciones del ion a determinar. En los resultados se muestra el % de fijación de nitrógeno que se ha producido durante las 48 h.

Tabla 9. Componentes y características del medio Jensen

Medio Jensen	pH 7
Componentes	Concentración (g L⁻¹)
Sacarosa	20
K ₂ HPO ₄	1
NaCl	0,5
Na ₂ MoO ₄	0,005
FeSO ₄	0,1
MgSO ₄	0,5
CaCO ₃	2

B.- Solubilización de P inorgánico: Tras inocular por duplicado una gota de 20 µL de la suspensión de suelo en el medio Pikovskayas comercial, se procede a la incubación a 30°C de las placas durante 7 días y se miden los halos de solubilización realizando la media entre las dos réplicas técnicas.

Tabla 10. Componentes y características Medio Pikovskayas

Medio Pikovskayas	pH 7
Componentes	Concentración (g L⁻¹)
Extracto de Levadura	0.5
Dextrosa	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
MgSO ₄	0.1
MnSO ₄	0.0001
FeSO ₄	0.0001
Agar	15

C.- Mineralización de P orgánico: Tras inocular por duplicado una gota de 20 μ L de la suspensión de suelo en el medio Pikovskayas modificado (sustituyendo el fosfato de calcio por el fitato cálcico como fuente orgánica de fósforo), se procede a la incubación a 30°C de las placas durante 7 días y se miden los halos de solubilización realizando la media entre las dos réplicas técnicas.

Tabla 11. Componentes y características Medio Pikovskayas

Medio Pikovskayas	pH 7
Componentes	Concentración (g L^{-1})
Extracto de Levadura	0.5
Dextrosa	10
Fitato cálcico	4
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
MgSO ₄	0.1
MnSO ₄	0.0001
FeSO ₄	0.0001
Agar	15

D.- Producción de sideróforos: Se inocula por duplicado una gota de 20 μ L de la suspensión de suelo en el medio MM9-CAS, a continuación, se incuban a 30°C las placas durante 7 días y se miden los halos de solubilización realizando la media entre las dos réplicas técnicas.

Tabla 12. Componentes y características Medio MM9-CAS

Medio MM9-CAS	pH 7
Componentes	Concentración
Solución 1	100 ml
10 ml de FeCl ₃ ·6H ₂ O	1 mM (disueltos en HCl 10 mM)
50 ml de CAS	1.21 mg ml^{-1}
40 ml HDTMA	1.82 mg ml^{-1}
Solución 2	
PIPES	30,24 g en 750 ml H ₂ O
KH ₂ PO ₄	0,3 g en 750 ml H ₂ O
NaCl	0,5 g en 750 ml H ₂ O
NH ₄ Cl	1,0 g en 750 ml H ₂ O
Solución 3	
Sacarosa	2,0 g en 70 ml H ₂ O
Manitol	2,0 g en 70 ml H ₂ O
MgSO ₄ ·7H ₂ O	493,0 mg en 70 ml H ₂ O
CaCl ₂	11,0 mg en 70 ml H ₂ O
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,17 mg en 70 ml H ₂ O
H ₃ BO ₃	1,4 mg en 70 ml H ₂ O
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,04 mg en 70 ml H ₂ O
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 mg en 70 ml H ₂ O
NaCl	0,5 g en 70 ml H ₂ O
Solución 4	
30 ml CAS aminoácidos	10% w v ⁻¹
Agar	15g L ⁻¹

E.- Movilización de potasio: Tras inocular por duplicado una gota de 20 μL de la suspensión de suelo en el medio Aleksandrow comercial con un marcador de pH (bromotimol), que indica donde hay producción de ácidos y con ella solubilización de potasio, se procede a la incubación a 30°C de las placas durante 7 días y se miden los halos de solubilización realizando la media entre las dos réplicas técnicas.

Tabla 13. Componentes y características medio Aleksandrow

Medio Aleksandrow	pH 7
Componentes	Concentration (g L⁻¹)
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.5
CaCO ₃	0.1
AlK ₆ O ₆ Si ₂	2
Dextrosa	5
FeCl ₃	0.005
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2
Bromotimol	5
Agar	20

F.- Producción de proteasas: Tras inocular por duplicado una gota de 20 μL de la suspensión de suelo en el medio en el medio de leche desnatada comercial, se procede a la incubación a 30°C de las placas durante 7 días y se miden los halos de solubilización realizando la media entre las dos réplicas técnicas.

Tabla 14. Componentes y Características Leche desnatada

Medio de leche desnatada	pH 7
Componentes	Concentration (g L⁻¹)
Leche desnatada	28
Triptona	5
Extracto de levadura	2.5
Dextrosa	1
Agar	15

4.3. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de las analíticas realizadas a las muestras del laboratorio se evaluaron estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA), utilizando la mínima diferencia significativa (LSD) para la separación de las medias. Los datos experimentales se analizaron con el software Statgraphics Centurion XVI (Gráficos estadísticos, Englewood, Cliffs, NJ, EE. UU.)

5. Resultados

Los análisis de los recuentos microbianos y las capacidades PGPR medidas se representan en las tablas 15-17. Inicialmente se ha realizado un análisis estadístico de los resultados considerando como factores el tratamiento y el momento de muestro (antes y después de la aplicación del producto), así como su interacción. Los resultados de este análisis se muestran en el Anejo 1. Con este análisis de datos, se ha observado que la variabilidad que presentaban alguno de los parámetros en el muestreo inicial no permitía analizar correctamente la evolución de las capacidades PGPB. Por ello se ha realizado un segundo análisis estadístico que analiza el incremento respecto al valor inicial de cada parámetro, eliminándose de esta forma la variabilidad inicial, observándose únicamente el efecto del tratamiento. Los parámetros, poblaciones generales y poblaciones fijadoras de nitrógeno, tienen un crecimiento exponencial y se cuantifican en logaritmos decimales. Dado que la población inicial es un parámetro influye determinantemente en su crecimiento, la evolución poblacional se ha estimado como relación entre población final e inicial. A continuación, se presentan por separado los resultados obtenidos en cada una de las fincas experimentales, tras lo cual, se discuten de manera conjunta.

5.1. Finca experimental 1

- Poblaciones generales: La aplicación de Micropull ha aumentado las poblaciones generales TSA, tal y como se observa en la figura 1, en comparación a las parcelas no tratadas, en los que las poblaciones han descendido. Con la aplicación del tratamiento se ha obtenido una relación entre las poblaciones final e inicial de 1,62 (considerada como cociente entre el valor final y el inicial), que ha resultado estadísticamente mayor ($p \leq 0,01$; tabla 15) que el obtenido en las parcelas control (0,54).

- Poblaciones fijadoras de nitrógeno: En el muestreo final ambas parcelas tratadas y no tratadas presentan un incremento en las poblaciones fijadoras de nitrógeno respecto al muestreo inicial. En las parcelas tratadas, las poblaciones fijadoras han sufrido un incremento estadísticamente significativo de 3,9 veces, estadísticamente superior ($p \leq 0,01$; tabla 15), al obtenido en las parcelas testigo.

- Fijación de nitrógeno: En el muestreo final, ambas parcelas, presentan un mayor porcentaje de nitrógeno fijado (figura 3). En las parcelas tratadas, la fijación ha aumentado un 40% con respecto al muestreo inicial, incremento estadísticamente mayor ($p \leq 0,01$; tabla 15) que el que han presentado las parcelas testigo.

- Mineralización de fósforo orgánico: Micropull incrementa la mineralización de fósforo orgánico, mientras que, en las parcelas no tratadas este disminuye para el muestreo final, tal y como se observa en la figura 4. El incremento de mineralización fósforo en un 67% es estadísticamente mayor que la evolución que se presenta en las parcelas no tratadas (-27%). La interacción de los factores muestreo por tratamiento, muestra también que los datos de las parcelas tratadas son estadísticamente mayores al del testigo ($p \leq 0,05$; figura 4).

El tratamiento no ha influido significativamente ($p \leq 0,05$) sobre los parámetros: solubilización de fósforo inorgánico, mineralización de potasio, producción de sideróforos y proteasas.

Tabla 15. Incremento obtenido tras la aplicación de Micropull en los parámetros: poblaciones generales (PG), poblaciones fijadoras de N (PFN), fijación de N (FN), solubilización de P inorgánico (SPI), mineralización P orgánico (MPO), movilización de K (MK), producción de sideróforos (PS) y producción de proteasas (PP). Finca experimental 1. Valores medios de 3 repeticiones.

	PG \bar{z}	PFN \bar{z}	FN \bar{y}	SPI \bar{y}	MPO \bar{y}	MK \bar{y}	PS \bar{y}	PP \bar{y}
Tratamiento								
Testigo	0,54 b	1,70 b	0,25 b	0,13	-0,27	0,14	-0,23	0,02
Tratamiento	1,62 a	3,97 a	0,40 a	0,30	0,67	-0,06	-0,03	0,02
%suma de cuadrados								
Tratamiento	91,62 **	90,33**	92,0 **	7,24 n.s	62,27 *	33,87 n.s	23,01 n.s	0,021 n.s
Residual	8,37	9,43	7,99	92,75	37,72	66,12	76,98	99,97

Z: parámetro determinado como cociente entre los valores final e inicial (-). Y: parámetros determinados como cociente entre la diferencia de los valores final e inicial y valor inicial (-). Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas. ** indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$). n.s: indica que no existen diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$).

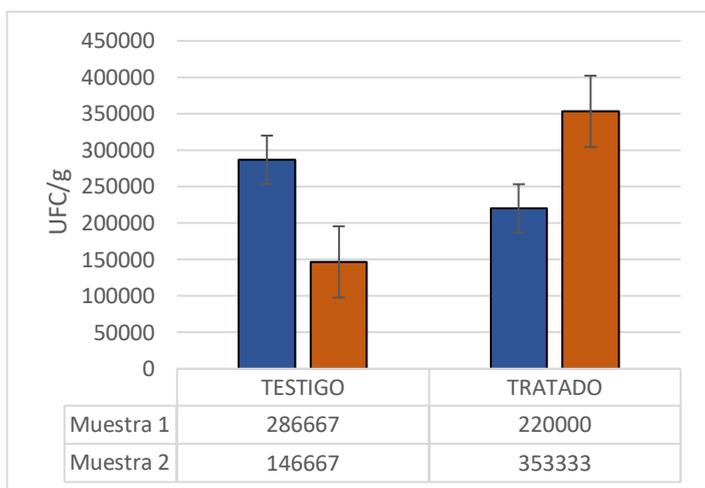


Figura 2. Poblaciones microbianas generales UFC (unidades formadoras de colonias) g^{-1} . Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull

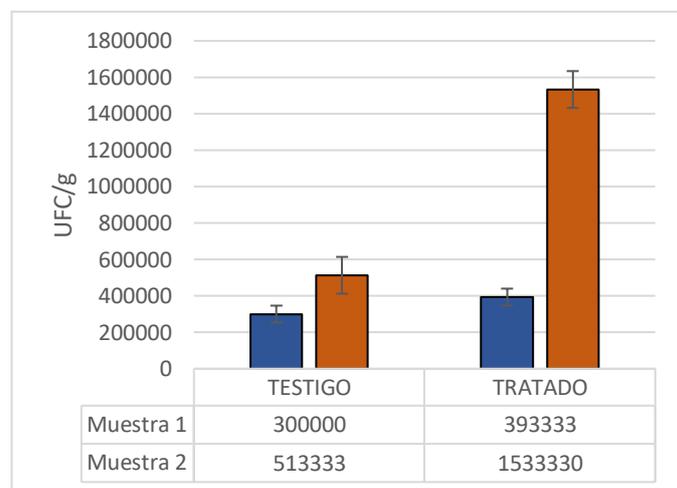


Figura 1. Poblaciones fijadoras de nitrógeno UFC (unidades formadoras de colonias) g^{-1} . Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull

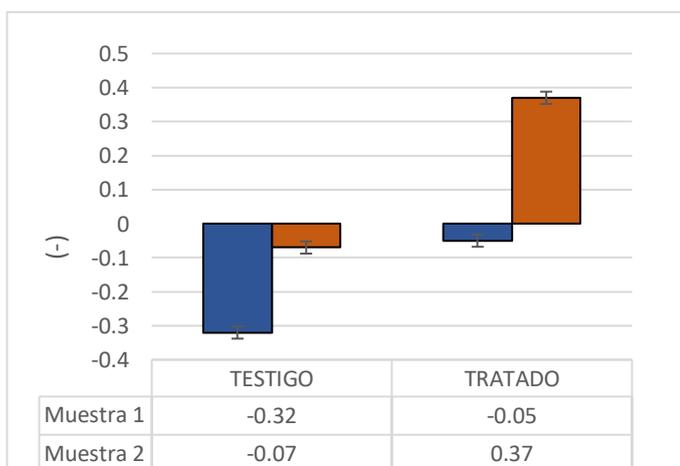


Figura 4. Fijación de nitrógeno en Medio Jesen comercial a las 48 h, determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.

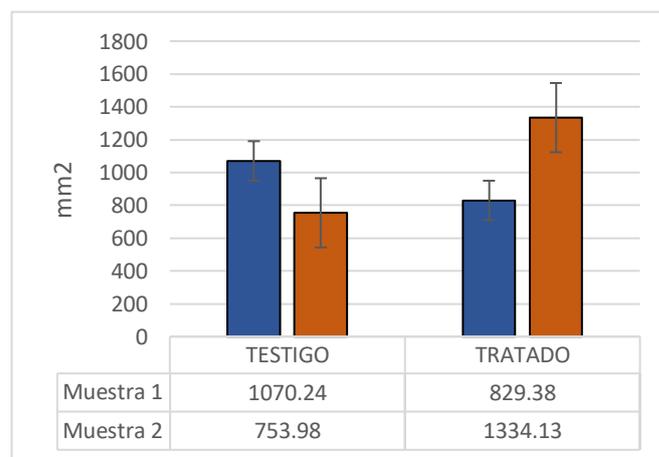


Figura 3. Mineralización de fósforo orgánico en mm^2 determinada al inicio y al final del tratamiento con Micropull.

La aplicación de Micropull ha permitido incrementar el calibre, peso medio y rendimiento final en las parcelas tratadas (tabla 16). Se observa aumento de calibre de un 7,65% en las parcelas tratadas respecto a las testigos, ($p \leq 0,05$), representado gráficamente en la figura 5. Por otro lado, como consecuencia de este incremento de calibre, el peso unitario de los frutos se ha visto incrementado en un 12,37% en las parcelas tratadas, resultando este peso estadísticamente mayor ($p \leq 0,05$; tabla 16) al del obtenido en las parcelas testigo. El rendimiento final obtenido para la parcela tratada ha sido de 34882 kg ha^{-1} , mientras que en la parcela control se han recolectado un total de 25606 kg ha^{-1} .

Tabla 16. Efecto del tratamiento en el calibre y en el peso medio de los frutos en la finca experimental 1, expresadas en medias por mínimos cuadrados y el % de la suma de cuadrados *($p \leq 0,05$) **($p \leq 0,001$).

Tratamiento (T)	Calibre (mm)	Peso (kg)
Testigo	53,17 b	0,078 b
Tratado	57,24 a	0,088 a
% suma de cuadrados		
Tratamiento	92,42 **	81,7 *

5.2. Finca experimental 2

- Poblaciones generales: En el muestreo final, ambas parcelas han incrementado las poblaciones generales de microorganismos, figura 7. Las parcelas que han recibido el tratamiento de Micropull se ha obtenido una relación entre las poblaciones final e inicial de 5 (considerado como cociente entre las poblaciones final y el inicial), significativamente mayor ($p \leq 0,01$; tabla 17) al crecimiento en las parcelas que no han recibido el tratamiento, cuya población ha aumentado por 2 en el segundo muestreo.

- Poblaciones fijadoras de nitrógeno: En la figura 8 se observa que el aumento de la población fijadora de nitrógeno tras la aplicación del biofertilizante para las parcelas tratadas es estadísticamente mayor ($p \leq 0,001$) cuando se estudia la interacción de los tiempos de muestreo y el tratamiento. No obstante, el crecimiento de población que se presenta dentro de cada tipo de parcela no muestra un incremento significativo en las tratadas con Micropull y las testigos.

- Fijación de nitrógeno: En las parcelas tratadas con Micropull, la fijación de nitrógeno que se produce en el muestreo final es un 1% mayor al producido en el muestreo inicial. Este aumento es estadísticamente mayor ($p \leq 0,05$; tabla 17) al observado en las parcelas que se tomaron como testigo, cuya fijación ha incrementado un 0,39% en el muestreo final.

- Solubilización de fósforo inorgánico: En el muestreo final, la solubilización de fósforo disminuye en ambas parcelas, tratadas y testigo (figura 9). Sin embargo, en las parcelas tratadas esta disminución es de -20%, menor estadísticamente ($p \leq 0,05$; tabla 17), que para las parcelas control - 84%.

- Movilización de potasio: Tras el tratamiento, se observa como en ambas parcelas experimentales, la movilización de potasio disminuye respecto al muestreo inicial. Es en las parcelas tratadas donde esta disminución es -53%, menor estadísticamente ($p \leq 0,05$: tabla 17), a la disminución del 86% que se presenta en las testigos.

El tratamiento no ha influido significativamente ($p \leq 0,05$) sobre los parámetros: mineralización de fósforo orgánico, producción de sideróforos y producción de proteasas

Tabla 17. Incremento obtenido tras la aplicación de Micropull en los parámetros: poblaciones generales (PG), poblaciones fijadoras de N (PFN), fijación de N (FN), solubilización de P inorgánico (SPI), mineralización P orgánico (MPO), movilización de K (MK), producción de sideróforos (PS) y producción de proteasas (PP). Finca experimental 2. Valores medios de 3 repeticiones

	PG \bar{z}	PFN \bar{z}	FN \bar{y}	SPI \bar{y}	MPO \bar{y}	MK \bar{y}	PS \bar{y}	PP \bar{y}
Tratamiento								
Testigo	2,08 b	10,94 b	0,39 b	-0,84 b	-0,29	-0,86 b	-0,24	1,38
Tratamiento	5,00 a	16,59 a	1,05 a	-0,20 a	-0,31	-0,53 a	0,07	1,89
%suma de cuadrados								
Tratamiento	93,42 **	26,72 n.s	71,36 *	70,72 *	0,26 n.s	75,40 *	39,77 n.s	12,36 n.s
Residual	6,52	73,24	28,63	29,29	99,73	24,59	60,22	87,63

Z: parámetro determinado como cociente entre los valores final e inicial (-). Y: parámetros determinados como cociente entre la diferencia de los valores final e inicial y valor inicial (-). Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas. ** indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$). * indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). n.s: indica que no existen diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$).

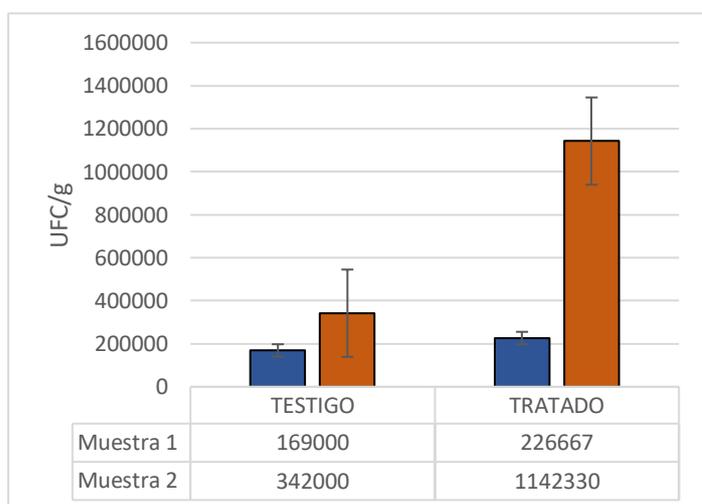


Figura 6. Poblaciones microbianas generales UFC (unidades formadoras de colonias) g⁻¹. Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.

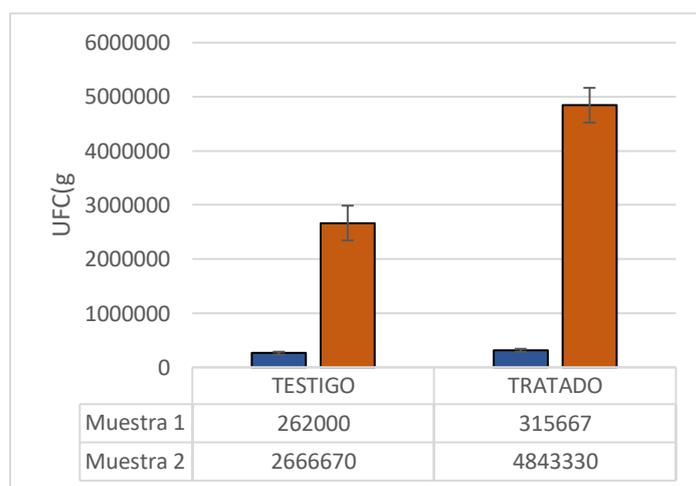


Figura 5. Poblaciones fijadoras de nitrógeno UFC (unidades formadoras de colonias) g⁻¹. Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.

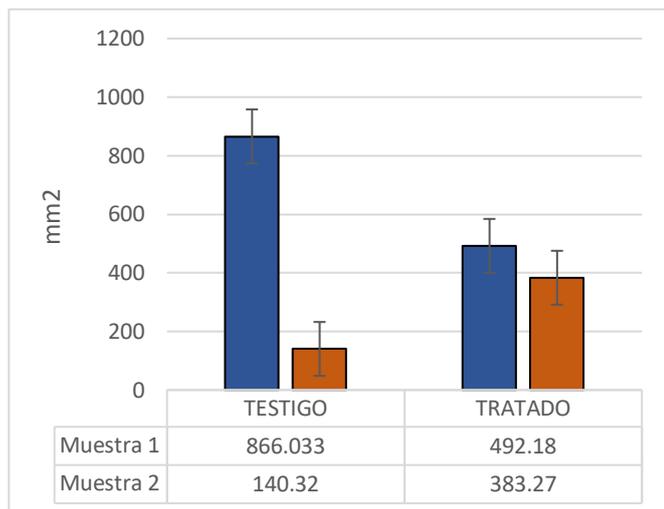


Figura 7. Solubilización de fósforo inorgánico (mm²) determinada al inicio y al final del tratamiento con Micropull.

Tras la aplicación de Micropull, en las parcelas tratadas el calibre y peso medio de fruto es mayor estadísticamente a las testigos (tabla 18), de esta forma, el rendimiento final también ha aumentado para estas parcelas. El aumento de calibre en las parcelas tratadas es un 6,98% superior a la de las testigos ($p \leq 0,05$; figura 10), así, el peso unitario final de los frutos tratados incrementa su peso un 19%, estadísticamente mayor ($p \leq 0,05$; figura 11) al del obtenido en las parcelas que actúan como testigo. El rendimiento final obtenido en la parcela tratada, se han obtenido un total de 31239 kg ha⁻¹, mientras que, en la testigo 30308 kg ha⁻¹.

Tabla 18. Efecto del tratamiento en el calibre y en el peso medio de los frutos en la finca experimental 1, expresadas en medias por mínimos cuadrados y el % de la suma de cuadrados * ($p \leq 0.05$)

Tratamiento (T)	Calibre (mm)	Peso (kg)
Testigo	71,55 b	0,193 b
Tratado	76,55 a	0,230 a
% suma de cuadrados		
T	76,73 *	75,88 *

6. Discusión de los resultados

La clave del éxito de los biofertilizantes es su capacidad para adaptarse al ambiente, colonizar el sistema radical y poder llevar a cabo su desarrollo. En condiciones de campo, diversas variables ambientales y edáficas juegan un papel en la actividad de las bacterias, así como la influencia que tienen en el desarrollo de las plantas: temperatura y humedad del suelo, contenido en materia orgánica, pH y el suministro de nutrientes inorgánicos ([Alexander, 1980](#); [Frioni, 2011](#); [Madiqan et al., 2004](#)). Las explotaciones objeto de estudio se encuentran en producción ecológica y presentan un pH ligeramente alcalino (8,4 en la finca experimental 1 y 8,1 en la 2); el suelo de la finca experimental 2 presenta un mayor contenido de materia orgánica (1,39%) que el de la finca número 1 (<0,5%).

La cepa bacteriana *Bacillus megaterium*, pertenece al género Bacillus, el más abundante en la rizosfera por su capacidad de colonización, solubilización de potasio y fósforo, aumento del

desarrollo, longitud, materia seca de la raíz, y rendimiento de las plantas ([Bhattacharyya y Jha, 2012](#)). Tras la inoculación, ambas explotaciones han incrementado sus poblaciones microbianas en comparación con las parcelas testigo. Dentro de estas, la finca 2, es la que presenta un mayor nivel poblacional de microorganismos, tanto generales como fijadores de nitrógeno, posiblemente por su mayor contenido inicial en materia orgánica.

Bacillus megaterium también está identificada como bacteria fijadora de nitrógeno ([Xie et al., 2003](#)). Como consecuencia del aumento de las poblaciones fijadoras de nitrógeno, en ambas explotaciones la fijación de nitrógeno ha incrementado tras la aplicación de Micropull. En esta ocasión se observa también como en la finca 2 esta fijación es mayor con respecto a la 1. Baldini en un trabajo realizado en 1996, afirma que un pH alcalino en el suelo reduce la actividad de la nitrogenasa e influye en la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos ([Ibarra, 2010](#)). Como se ha comentado, las fincas presentan un pH ligeramente alcalino, factor que puede haber afectado negativamente a la fijación de nitrógeno.

Diversos estudios describen a *Bacillus megaterium* como solubilizadora de fósforo orgánico e inorgánico, por su capacidad para liberar ácidos orgánicos ([Rajankar et al. 2007](#)); según Mehnaz 2016 se puede llegar a reducir la aplicación de fósforo en un 75% en los cultivos. Sin embargo, se puede observar cómo únicamente en la finca experimental 1, después de la aplicación del biofertilizante se ha incrementado la mineralización del fósforo orgánico, debido posiblemente a que la aplicación de fósforo se realiza en forma orgánica. En la finca 2, no se realiza aporte de fósforo y tras la aplicación de Micropull, nos encontramos que tanto la solubilización del fósforo inorgánico como la mineralización del orgánico ha disminuido tanto en las parcelas tratadas como en las testigos. Shin et al. (2004) y Cakmakci et al. (2006) explican que el efecto de las bacterias solubilizadoras de fósforo puede variar dependiendo de las condiciones medio ambientales y de las condiciones de cultivo. Por otro lado, Gyaneshwar et al. (2002) indica que otros componentes del medio de cultivo también pueden afectar a la solubilización del fósforo inorgánico como, por ejemplo, el contenido de potasio. Otros estudios afirman que los mejores resultados en cuanto a la aplicación de bacterias solubilizadoras de fósforo se han visto cuando son aplicadas con otras cepas con capacidad para fijar el nitrógeno, micorrizas u hongos no micorrízicos ([Rojas et al., 2001](#)). Esta misma situación se presenta con la movilización de potasio, donde la aplicación del biofertilizante no la ha incrementado en ninguna de las dos fincas. Al depender ambos procesos de la liberación de ácidos orgánicos, es posible que la cepa no haya sido capaz de llevar a cabo este proceso debido a algún factor externo no estudiado.

La síntesis de sideróforos incrementa cuando los microorganismos se encuentran en condiciones limitantes de hierro. La disponibilidad de hierro disminuye cuando el pH está en torno a 7,5-8,5, mientras que la materia orgánica mejora la disponibilidad de hierro al combinarse con este metal y favorecer el crecimiento de las poblaciones microbianas. Algunos estudios muestran la capacidad de producir sideróforos por *Bacillus megaterium* en varias especies, como, por ejemplo, el té ([Chakraborty et al., 2006](#)). Se puede observar que, en la finca experimental 1 la producción de sideróforos ha sido mayor que en la finca experimental 2, debido probablemente a que la reserva de hierro en el suelo sea menor. Además, esta producción de sideróforos disminuye en el muestreo final lo que puede ser debido a la aplicación de hierro en forma quelatada que se produce durante los meses de primavera que incrementa el contenido de hierro en el suelo.

La producción de enzimas líticas tales como las proteasas por *Bacillus megaterium*, le otorga la capacidad de actuar como agente de biocontrol debido a que es capaz de reducir la incidencia o gravedad de las enfermedades en las plantas, degradando la pared celular de los

patógenos ([Chaiharn et al., 2008](#)). La producción de proteasas no se ha visto afectada significativamente para ninguna de las parcelas experimentales.

En cuanto al manejo de la fertirrigación que se ha llevado a cabo en las fincas experimentales, ambas emplean abonos orgánicos autorizados en agricultura ecológica y, como se puede observar en las tablas 3 y 6, la cantidad de nutrientes empleados difiere para las dos fincas experimentales. Pese a que las unidades fertilizantes aplicadas en la finca experimental 2 son visiblemente superiores a las aplicadas en la finca 1, los datos obtenidos tras la aplicación del biofertilizante no parecen tener relación. Según Berendsen et al. (2015), los suelos agrícolas que tienen una ecología microbiana dinámica y un alto porcentaje de materia orgánica, característico de suelos con manejo en ecológico, presentan una menor necesidad de fertilizantes que los suelos cuyo manejo es convencional, es por ello, que el uso de este tipo de microorganismos se debe considerar cuando las fincas se encuentran en producción ecológica.

Armenta-Bojórquez et al. (2010), reportan el incremento de productividad significativo que la inoculación de biofertilizantes con bacterias PGPB ha tenido en los cultivos agrícolas. Se observa en la finca experimental 1, como el rendimiento ha aumentado en un 26,59% en la parcela tratada respecto a la testigo. Este incremento de producción puede estar asociado a varios factores que tienen relación con el biofertilizante aplicado. El primero de ellos, debido al aumento de la población de microorganismos totales y fijadores de nitrógeno en el suelo, que, han permitido incrementar la fijación de nitrógeno. Además, tras la aplicación del biofertilizante, se incrementó la mineralización del fósforo orgánico, dando más disponibilidad de fósforo a la planta. Por otro lado, el aumento de rendimiento también está asociada al destrío. En el momento de la recolección se observó que, en la parcela testigo había un mayor porcentaje de frutos afectados por una fisiopatía que se produce en las mandarinas clementinas como consecuencia de un estrés abiótico producido en verano ocasionado por altas temperaturas y bajas humedades relativas; con estas condiciones meteorológicas, la planta entra en parada y deja de haber transpiración. Como consecuencia, se produce en la parte inferior del fruto una desecación de las células, fenómeno denominado “sun-burn” ([Chaves-Barrantes y Gutiérrez-Soto, 2017](#)) y devaluando económicamente la fruta. En la parcela tratada, se observó que el porcentaje de mandarinas afectadas por esta fisiopatía era menor. Las especies del género *Bacillus* son capaces de producir esporas, que les permiten resistir condiciones ambientales adversas ([Raza et al., 2016](#)), por otro lado, las PGPR tienen la capacidad de producir ACC desaminasa que regula la concentración de etileno en las plantas y reduce los efectos causados por el estrés. En la parcela tratada, se observó que el porcentaje de frutos afectados por esta fisiopatía era menor, aunque no fue cuantificada.

En la finca experimental 2, en el momento que se tomaron los datos correspondientes a la producción, se observó un mayor calibre y peso medio de los frutos en la parcela tratada que en la parcela testigo. No obstante, la parcela testigo se recolectó un mes más tarde que la parcela tratada, este tiempo de margen y las lluvias caídas durante este periodo ayudaron a que la fruta de la parcela testigo incrementara su calibre y peso, aumentando el rendimiento final obtenido y consecuentemente reduciendo las diferencias respecto a la parcela tratada.

7. Propuesta de mejora

El presente Trabajo Final de Máster se planteó como una colaboración con la casa comercial del biofertilizante Micropull. En un primer momento se planificó en un total de 6 fincas, pero por motivos ajenos, finalmente solo se han podido analizar los resultados obtenidos en las dos

fincas experimentales presentadas. Tanto el diseño experimental como la metodología analítica aplicada, está basada en experiencias anteriores de la empresa.

A la vista de los resultados obtenidos y viendo la gran variabilidad en los datos, y especialmente en los datos de partida en cada finca, es probable que realizando cambios en el diseño experimental permitiría analizar con mayor precisión el efecto del tratamiento.

Para poder realizar un trabajo más profundo a nivel de campo, donde múltiples factores externos condicionan los resultados finales, sería aconsejable centrar el proyecto en únicamente una finca experimental. Y, una vez se tenga la metodología de trabajo definida, extrapolarlo a un proyecto más ambicioso en el que se consideren un mayor número de fincas.

En los resultados del trabajo se observa cómo en alguno de los parámetros analizados, los datos de partida no presentan la uniformidad suficiente en toda la parcela. Para eliminar esta variabilidad, se debería aumentar el número de muestras a analizar por hectárea, tanto aumentando el número de repeticiones, como el número de submuestras de suelo por repetición (considerando los cuatro puntos cardinales del árbol por punto de muestra). Por otro lado, para conocer mejor la situación de partida en la que se encuentra la parcela, a cada una de estas muestras de suelo habría que realizarle un análisis físico-químico y microbiológico completo. Otros parámetros que se podrían analizar ya que ayudarían a comprender mejor los resultados del trabajo serían: análisis nutricional de la hoja (utilizando el mismo número de muestras que para los análisis de suelo), actividad fotosintética, concentración de clorofila en hoja, etc. También se deberían cuantificar y evaluar son las fisiopatías que afectan al fruto y lo devalúan económicamente, particularmente la clareta en naranja, endoseriosis en limón o planchado de la piel en mandarinas tempranas, consecuencia todas de condiciones meteorológicas adversas.

En el presente trabajo se han realizado únicamente dos muestreos en el tiempo, el primero de ellos previo a la inoculación y el segundo 3-4 semanas después de la última aplicación, debido a que es el tiempo estimado para que las bacterias se adapten al suelo y desarrollen su capacidad PGPB. Sin embargo, alguno de los parámetros que no muestran diferencias significativas, podrían estar más relacionados con el momento de la toma de muestras que con la eficacia del producto. El cultivo de los cítricos, en función del estado fenológico en el que se encuentre, tiene diferentes demandas nutricionales. Para comprobar si las capacidades de las bacterias aumentan o disminuyen en función de la demanda nutricional del árbol, habría que realizar como mínimo un muestreo durante cada uno de los estados fenológicos. Para profundizar en el conocimiento de la actividad de la bacteria y por tanto del efecto que produce el producto en cada estado fenológico, se debería analizar periódicamente parámetros como brotación, floración, número (o porcentaje) de frutos cuajados, tamaño de fruto, índice de madurez del fruto, etc.

La aplicación del producto se realizó a la salida de la parada vegetativa, ya que es el momento en el que el árbol tiene una mayor demanda nutricional. No obstante, la aplicación de este producto en cualquier otro estado fenológico, incluyendo el estado previo a la entrada en parada vegetativa podría dar resultados diferentes, por lo que se aconseja su análisis.

Como se puede observar, el efecto que tiene la aplicación de un biofertilizante es variable debido a que la relación que establecen las bacterias con las plantas varía en condiciones de campo, donde se presentan numerosos factores externos y la capacidad de las bacterias puede verse afectada, debido a las condiciones del suelo, al microbiota ya presente o las prácticas de manejo sería aconsejable ampliar el estudio en otras condiciones ambientales, edafológicas y de manejo.

8. Conclusiones

La aplicación de Micropull ha permitido incrementar las poblaciones generales de microorganismos, las fijadoras de nitrógeno y la fijación de nitrógeno en ambas explotaciones. En una de las fincas experimentales, la mineralización de fósforo orgánico se ha incrementado significativamente tras la inoculación. Ambas parcelas experimentales han obtenido un mayor rendimiento final, mayor calibre y peso medio del fruto.

El empleo de este tipo de productos está influenciado por un gran número de variables externas que condicionan la actividad que los microorganismos desarrollan, probablemente por ello algunos parámetros analizados no se ven afectados significativamente por la inoculación. Debido a esto se ha planteado un nuevo diseño experimental en el que se tengan en cuenta un mayor número de factores para encontrar una mayor correlación entre las capacidades PGPB analizadas y los parámetros de campo estudiados.

Pese a los resultados obtenidos en el trabajo y el gran desconocimiento sobre cómo estas bacterias se adaptan y trabajan en explotaciones comerciales, los productos formulados a base de bacterias PGPB se plantean como una alternativa sostenible al escenario que la agricultura actualmente atraviesa en el que se pretende incrementar las producciones, disminuyendo los recursos utilizados.

9. Bibliografía

Aguado-Santacruz, G.A., Rascón-Cruz, Q. y Luna-Bulbarela, A. (2012). Impacto Económico y Ambiental del Empleo de Fertilizantes Químicos. Aguado-Santacruz, G.A. ed9. Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. 01-23. INIFAP/SAGARPA.

Ahmed, E. y Holmstrom, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microb. Biotechnol.* 7: 196-208.

Ali, B. (2015). Bacterial auxin signaling: Comparative study of growth induction in *Arabidopsis thaliana* and *Triticum aestivum*. *Turk J. Bot.* 39:1-9.

Alexander, M. (1980) Introducción a la microbiología del suelo. Traducción por Peña, Juan José. 2a ed en inglés. México: AGT. 89 p.

Banik, S. y Dey, B.K. (1982). Available phosphate content of an alluvial soil is influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. *Plant Soil* 69: 353-364.

Barrera, A. (2011). Nuevas realidades, nuevos paradigmas: la nueva revolución agrícola. *Comunica online*, 8. 10-13.

Bashan, Y., De-Bashan, L.E., Prabhu, S.R. y Hernández, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378, 1-33.

Bautista, J. (2011). Realidad y futuro de la citricultura. *Phytoma*, núm. 230. 20-28.

Baziramakenga, R., Simard, R. y Leroux, G. (1995). Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil. Biol. Biochem.* 27: 349-356.

Berendsen, R.L., Pieterse, C.M. y Bakker, P.A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci*, 17,478-486.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., y Passaglia, L. M., (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35, 1044-1051.

Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K. y Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13, 1-10.

Bhattacharyya, P.N., y Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:1327-1350.

Borrás, P. (2021). Panorama general de los cítricos en España. Distribución y Consumo. Vol. 2. 32-36.

Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G. y Estrada-de los Santos, P. (2004). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1165-72.

Çakmakçı, R., Dönmez, F., Aydm, A. y Sahin, F. (2006). Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol Biochem* 38:1482– 1487

Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., Kozo, A. y Lumyong, S. (2008). Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. *KMITL Sci Technol J*, 8,18-23.

Chaves-Barrantes, N.F. y Gutiérrez-Soto, M.V. (2017). Respuestas al estrés por calor en los cultivos. I. Aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos. *Agron. Mesoam*, 28: 237-253.

Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W. y Young, C.C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34:33-41.

Colombo, C., Palumbo, G., He, J., Pinton, R. y Cesco, S. (2014). Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *J. Soils Sed.* 14: 538–548.

Conte, S. S. y Walker, E. L. (2011). Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Mol. Plant* 4: 464–476.

Cotler, H., Martínez, M. y Etchevers, J. (2016). Carbono orgánico en suelos agrícolas de México: Investigación y políticas públicas. *Terra Latinoamericana*, 34: 125-138.

Crewsa, T.E. y Peoples, M.B. (2004). Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agr. Ecosyst. Environ.* 102:279-297.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. y Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Pant Sci*, 22:107-149.

- Ehrlich, H. L.** (1990). Geomicrobiology, 2nd edn. Dekker, New York, p646.
- FAO y GITS.** (2015). Estado Mundial del Recurso Suelo (EMRS)- Resumen técnico. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura y Grupo Técnico Intergubernamental del Suelo. Roma. Italia.
- FAO y Nets.** (2018). Guía de buenas prácticas para la gestión y uso sostenible de suelos en áreas rurales. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Bogotá. Colombia.
- Fernández, C. y Novo R.** (1988). Vida microbiana en el suelo, II. Universidad de La Habana: Ed. Pueblo y Educación p:525
- Fernández-Zamudio, M. A.** (2021). La citricultura valenciana, la evolución de sus costes de producción e insumos que los determinan. Levante Agrícola, 455: 57-62.
- Fibach-Paldi, S., Burdman, S. y Okon, Y.** (2012). Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 326:99-108.
- Frioni, L.** (1999). Procesos microbianos. Tomo I. Argentina: Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. 67 p.
- García- Seco, D.** (2017). La Rizosfera de los Cultivos: la Clave Oculta para el Rendimiento Sostenible de la Agricultura. Serie Suelos Núm. 32. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 3 p.
- Glick B.R., Patten, C.L., Holguin, G. y Penrose, D.M.** (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting. Imperial College Press. London. 267.
- Glick, B. R.** (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica, Volume 2012, Article ID 963401, 15 pages.
- Gray, E.J. y Smith, D.L.** (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem*, 37: 395-412.
- Goldstein, A. H.** (1986). Bacterial solubilization of microbial phosphates: a historical perspective and prospects. *Am J Altern Agric*, 1: 51-57.
- Goldstein, A.H.** (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous mineal phosphates by Gram negative bacteria. In: Torriani- Gorni A, Yagil E, Silver S. Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, pp 197-203.
- Gügi, B., Orange, N., Hellio, F., Burini, J.F., Guillou, C., Leriche, F. y Guespin-Michel, J.F.** (1991). Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotropic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol*, 173: 3814-3820.
- Guo, J. H., Qi, H.Y., Guo, Y.H., Ge, H.L., Gong, L.Y. y Zhang, L.X.** (2004). Biocontrol of tomato wilt by plant growth promoting rhizobacteria. *Biol control*, 29: 66-72.

Gyaneshwar, P., Parekh, L.J., Archana, G., Poole, P.S., Collins, M.D., Hutson, R.A. y Kumar, G.N. (1999). Involvement of a phosphate-starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 171: 223-229.

Guzmán estrada, E.A. (2011). Aislamiento y Caracterización de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo a partir de cuatro suelos de la Provincia de Chimborazo. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D. y Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón. (*Gossypium hirsutum*). *Rev. Colomb. Biotecnol*, 14:182-90.

Halder, A.K., Misra, A.K, Bhattacharya, P. y Chakrabarthy, P.K. (1990). Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium and Bradyrhizobium*. *J Gen Appl microbiol*, 36:1-92.

Halder, A.K., Misra, A.K. y Chakrabarthy, P.K. (1991). Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium*. *Indian J Exp Biol*, 29: 28-31.

Hernández, D.M. y Charlloux, M.L. (2001). La nutrición mineral y biofertilización en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Temas Ciencia Tecnol*, 5:11-27.

Hinsinger P., Gobran, G.R., Gregory, P.J. y Wenzel, W. (2005). Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol*, 168: 293-303.

Ibarra, C.L. (2010). Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo de Chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola. [Tesis]. Escuela nacional de ciencias biológicas, sección de estudios de posgrado e investigación. Departamento de Microbiología. México.

International Fertilizer Association (IFA), (2018), Estadísticas accedidas el 19/01/2018 en www.fertilizer.org/En/Statistics/Statistics_Databases.

Jetiyanom, K. y Kloepper, J.W. (2002). Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Bio Control*, 24: 285-291.

Jeyanthi, R. (2013). Screening, optimisation, and application of extracellular phytase from *Bacillus megaterium* isolated from poultry waste. *Journal of modern biotechnology*, 2: 46-52.

Jha, C.K. y Sarai, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of agricultural research and development*, 5.

Khan, A.G. (2005). Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol*. 96: 473-480.

Martínez-Centero, A.L. y Huerta Sobalvarro, K.K. (2018). La revolución verde. *Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio climático. Vol. 4, núm 8. 1045:1046.* <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/394/3941755011/index.html>.

Kloepper, J.W. (1993). Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. *Soil microbial ecology: Applications in agricultural and environmental Management. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents (Metting, F.B., Jr. pp. 255-274).*

- Lynch, J.M.** (1990). *The rhizosphere*, Wiley-Interscience, Chichester. UK.
- Lucas, G.J.A., Probanza, A., Ramos, B., Palomino, M.R. y Gutierrez Mañero, F.J.** (2004). Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie*, 24: 169–176.
- Mayz-Figueroa, J.** (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Rev. Científ. UDO Agríc*, 4: 1-20.
- MAPAMA.** (2019). Anuario de Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Martínez, I.** (2020). De la granja a la mesa, una estrategia del Pacto Verde Europeo. *Bio eco actual*. Núm, 79: 6-7.
- Meena, V.S., Maurya, B.R., y Verma, J.P.** (2014). Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? *Microbiological Research*, 169:337.
- Mehnaz, S.** (2016). An overview of globally available bioformulations. *Bioformulations: For Sustainable Agriculture*, eds N. K. Arora, S. Mehnaz, and R. Balestrini (Berlin: Springer). 267–281.
- Mishra, P. y Dash, D.** (2014). Rejuvenation of Biofertiliser for Sustainable Agriculture Economic Development Consilience. *Journal of Sustainable Development*, 11: 41-61.
- Molina-Romero, D.M., Bustillos-Cristales, O., Rodríguez-Andrade, Y.E., Morales-García, Y., Santiago-Saenz, M., Castañeda-Lucio, M. y Muños Rojas, J.** (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*, 17: 24-34.
- Morrissey, J. y Guerinot, M.L.** (2009). Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chem. Rev*, 109: 4553–4567.
- Nicholson, W.L., Fajardo-Cavezos, R., Rebeil, T.A., Slieman, P.J., Law, J.F. y Xue, Y.** (2002). Bacterial endospores and their significance in stress resistance, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81. 27–32.
- Oberson, A., Frossard, E., Bühlmann, C., Mayer, J., Mäder, P. y Lüscher, A.** (2013). Nitrogen fixation and transfer in grassclover leys under organic and conventional cropping systems. *Plant Soil*, 371: 237–255.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.** World Population Prospects 2019: Highlights. ST/ESA/SER.A/423.
- Paredes, M. y Espinosa, D.** (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfatos: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28:61-70.
- Parmar, P., y Sindhu, S.S.** (2013). Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of microbiology research*, 3:25-31.
- Parray, J.A., Jan, S., Kamili, A.N., Qadri, R.A., Egamberdieva, D. y Ahmad, P.** (2016). Current perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35:877-902.

Patten, C.L. y Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J microbiol*, 42:207-220

Pereira, S.I.A., Monteiro, C., Vega, A.L. y Castro, P.M.L. (2016). Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: isolation, characterization, and evaluation of their plant growth-promoting activities. *Ecol. Eng*, 87: 91-97.

Raj, S. N., Deepak, S.A., Basavaraju, P., Shetty, H.S., Reddy, M.S. y Kloepper, J.W. (2003). Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. *Crop Prot*, 22: 579-588.

Raza, W., Wang, J., Wu, Y., Ling, N., Wei, Z., Huang, Q. y Shen, Q. (2016). Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100: 1-12.

Richardson, A.E. y Hadobas, P.A. (1997). Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Microbiol*, 43:509:16

Robertson, G.P. y Groffman, P.M. (2015). Nitrogen transformations. E. A. Paul, ed. *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. Fourth edition. Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA, 441-446.

Rodríguez, H. y Fraga., R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv*, 17: 319-339.

Rojas, G. Holguin, B.R. Glick, Y. y Bashan. (2001). Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (p-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiology ecology*, 35:2:181-187.

Römheld V. y Kirkby E.A. (2010). Research on potassium in agriculture needs and prospects. *Plant Soil*, 335:155–80.

Ropero Portillo, S. (2020). Revolución verde: qué es, ventajas y desventajas. *Ecología verde*. <https://www.ecologiaverde.com/revolucion-verde-que-es-ventajas-y-desventajas-3043.html>

SaravanaKumar, D., Lavanya, N., Muthumeena, b., Raguchander, T., Suresh, S. y Samiyappan, R. (2008). *Pseudomonas fluorescens* enhances resistance and natural enemy population in rice plants against leaf folder pest. *J Appl Entomol*, 132: 469-479.

Saha, R., Saha, N., Donofrio, R.S. y Bestervelt, L. L. (2013). Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol*, 53: 303-317.

Schroth, M.N. y Becker, J.O. (1990). Biological control of soil-borne plant pathogens. 5th International Congress of Plant Pathology, Kyoto, Japan. pp. 389-414.

Sevilla, M., Burris, R.H., Gunapala, N. y Kennedy, C. (2001). *Mol. Plant-Microb. Interact*, 14:358-66.

Sheng, X. F., Zhao, F., He, L. Y., Qiu, G. y Chen, L. (2008). Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus globisporus* Q12 from the surfaces of weathered feldspar. Canadian journal microbiology, 54: 1064-1068.

Shen, M., Jun-Kang, Y., Li-Wang, H., Sheng-Zhang, X. y Xin-Zhao. Q. (2012). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) on plant growth, yield, and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under simulated seawater irrigation. J. Gen. Appl. Microbiol, 58: 253-262.

Solanki, M. K., Singh, R. K., Srivastava, S., Kumar, S., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K. y Arora, D. K. (2013). Isolation and characterization of siderophore producing antagonistic rhizobacteria against *Rhizoctonia solani*. J Basic Microbiol, 1-14.

Supanjani, Han, H.S., Jung, S.J. y Lee, K.D. (2006) Rock phosphate potassium and rock solubilizing bacteria as alternative sustainable fertilizers. Agronomy and Sustainable Development, 26: 233-240.

Tejera, B., Heydrich, M., y Rojas, M. (2013). Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. Agronomía Mesoamericana, 24: 357–364.

Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M. y Heydrich- Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 42: 131-138.

Timmusk, S., Paalme, V., Pavlicek. (2011): Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates. Plos One, 6:3.

Torsvik, V.Y. y Ovreas, L. (2002). Microbial diversity and function in soils: from genes to ecosystems. Curr. Opin. Microbiol, 5: 240-245.

Vary, P.S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M. y Deckwer, W.D. (2007) *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. Appl Microbiol Biotechnol, 76: 957-967.

Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil, 255: 571-586.

Xie, G., Cai, M., Tao, G., y Steinberger, Y. (2003). Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze River Plain. Biology and fertility of Soils, 37:29-38.

Zacarías, L. y Lafuente, M.T. (2008). Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo. Fundamentos de Fisiología Vegetal, 445-467.

Zarjani J.K., Aliasgharzad. N., Oustan, S., Emadi M. y Ahmadi A. (2013). Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils. Arch Agro Soil Sci., 77:756.

ANEJO I. Análisis estadístico conjunto de los factores muestreo y tratamiento.

En este apartado se muestra el análisis estadístico de los recuentos microbianos y las capacidades PGPR medidas en relación con el tratamiento y a la fecha del análisis. De esta manera, se evalúa la significancia de las interacciones entre los dos factores estudiados. Los datos se muestran en la tabla 19 y 20, expresados como valor medio de cada nivel de los dos factores y el porcentaje de la suma de cuadrados para ambos factores y su interacción

1.1. Finca Experimental 1

- Poblaciones generales TSA. En la tabla 19 se observa que, la evolución de las poblaciones microbianas no es significativa para el factor muestreo. El factor tratamiento si muestra una diferencia significativa en el número de microorganismos con un 95% de nivel de confianza. En cuanto a la interacción tratamiento por muestreo, el nivel de confianza aumenta al 99,9% ($p \leq 0,001$; tabla 19). De esta forma, se observa en la figura 12 como en el muestreo inicial, las parcelas testigo contaban con una mayor población microbiana, que se ha visto disminuida en el muestreo final. Sin embargo, para las parcelas tratadas se ve un aumento de la población en el muestreo final respecto al inicial.

- Poblaciones Fijadoras de Nitrógeno. El estudio de las poblaciones fijadoras de nitrógeno muestra significancia estadística en sus datos con un nivel de confianza del 99,9% para los factores muestreo y tratamiento y la interacción entre ambos ($p \leq 0,001$; tabla 19). En la figura 13 se observa como en el muestreo inicial, todas las parcelas (tratadas y testigo) parten de una situación similar. En el muestreo final, se observa como las parcelas testigo han pasado de 300000 microorganismos a 513333, mientras que, las tratadas de 393333 a 1533330 microorganismos fijadores de nitrógeno.

- Fijación de nitrógeno. El % de fijación de nitrógeno que se produce presenta significancia estadística en los datos con un nivel de confianza del 99% para los factores muestreo y tratamiento y la interacción entre ambos ($p \leq 0,01$; tabla 19). Se observa en la gráfica, como en el muestreo inicial, este % es negativo para ambas parcelas, tratadas y testigo. Es en el muestreo final, después del tratamiento, cuando las parcelas tratadas incrementan esta fijación de nitrógeno a un 0,4%.

- Mineralización P orgánico. Los factores muestreo y tratamiento no presentan significancia estadística en los datos. Sin embargo, su interacción tiene un efecto estadísticamente significativo del 95% de nivel de confianza ($p \leq 0,05$; tabla 21). Esto indica que, tal y como se ve en la figura 15, la mineralización disminuye en el muestreo final respecto al inicial en las parcelas testigo. Mientras que, en las parcelas tratadas, aumenta la mineralización de fosforo orgánico.

El tratamiento no ha influido significativamente ($p \leq 0,05$) sobre los parámetros: solubilización de fósforo inorgánico, movilización de potasio, producción de sideróforos y proteasa

Tabla 19. Evolución a nivel microbiológico de las capacidades PGP atribuidas al producto MICROPULL en la finca Experimental 1. Valores medios de 6 repeticiones

		TSA (UFC/g)	Poblaciones Fijadoras N (UFC/g)	Fijación de nitrógeno (%)	Solubilización P inorgánico (mm2)	Mineralización P orgánico (mm2)	Movilización de K (mm2)	Producción de sideróforos (mm2)	Producción de proteasas (mm2)
Muestreo (M)									
	Muestreo 1	253333	346667 b	-0,18 b	795	949	1623	1109	1347
	Muestreo 2	250000	1023330 a	0,15 a	958	1044	1684	920	1311
Tratamiento (T)									
	Testigo	216667 b	406667 b	-0,19 a	893	912	1720	963	1145
	Tratamiento	286667 a	963333 a	0,16 b	860	1081	1587	1066	1514
% suma de cuadrados									
M		0,003 n.s	45,19 ***	45,89 ***	11,1 n.s	11,1 n.s	0,56 n.s	7,01 n.s	0,28 n.s
T		15,9 *	30,58 ***	50,50 ***	0,47 n.s	0,47 n.s	2,6 n.s	2,08 n.s	29,29 n.s
M * T		60,66 ***	2,11 ***	3,21 ***	0,47 n.s	49,52*	2,6 n.s	3,83 n.s	0,28 n.s
Residual		23,38	3,02	0,38	87,94	39,40	94,23	87,06	70,14
<p>En la parte superior, se muestran las medias por mínimos cuadrados con un intervalo de confianza del 95% para los dos efectos principales: M: Muestreo, tomando los datos respectivos al muestreo 1 (antes de la aplicación del tratamiento) y muestreo 2 (después de la aplicación del tratamiento). T: Tratamiento, corresponde a los datos relativos al testigo y al tratado. En la parte inferior, se muestra el % de suma de cuadrados, indicando que factor (M, T o M*T) es significativo estadísticamente en cada parámetro. N.s: no significativo. *p<0,05. **p< 0,001 **p<0,0001</p>									

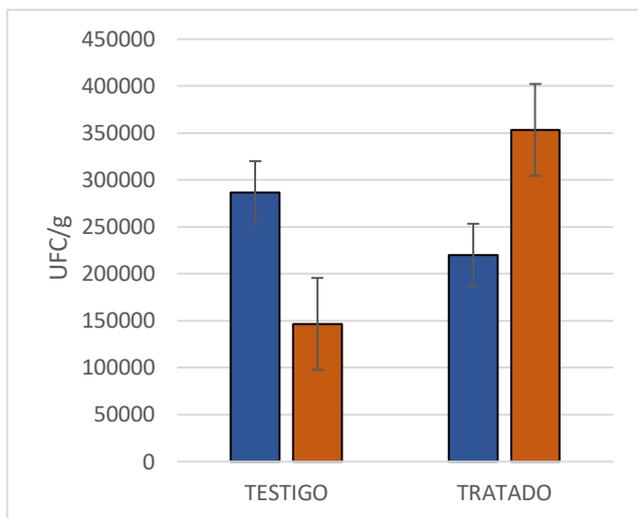


Figura 9. Poblaciones microbianas generales UFC (unidades formadoras de colonias) g⁻¹. Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.

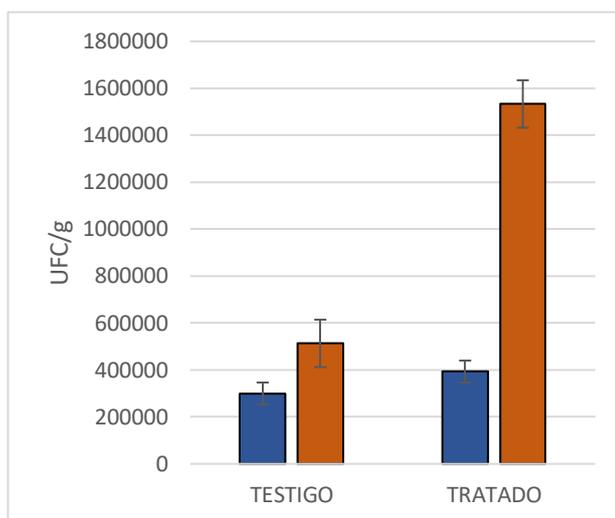


Figura 8. Poblaciones fijadoras de nitrógeno UFC (unidades formadoras de colonias) g⁻¹. Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull

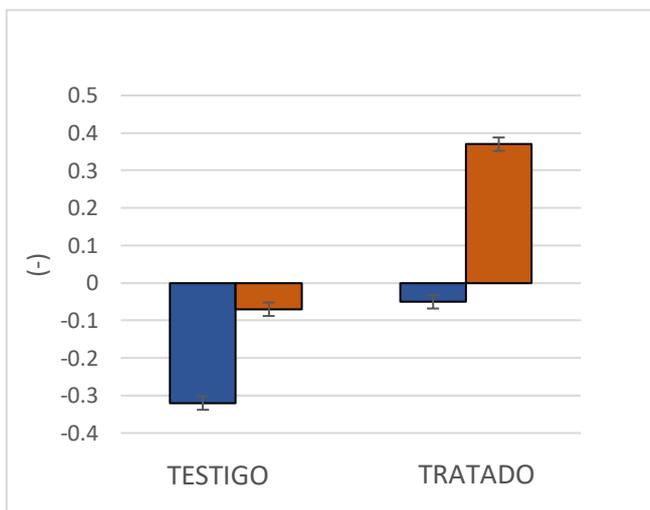


Figura 11. % Fijación de nitrógeno en Medio Jesen comercial a las 48 h, determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.

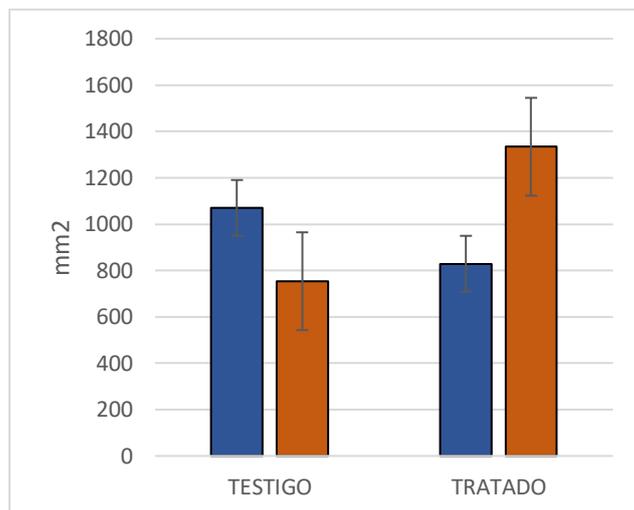


Figura 10. Mineralización de fósforo orgánico en mm² determinado al inicio y al final del tratamiento con Micropull. Interacción muestra por tratamiento

1.2. Finca experimental 2

- Poblaciones Generales TSA

Como se puede observar en la tabla 20, los tres factores analizados tienen un efecto significativamente estadístico para las poblaciones generales de microorganismos ($p \leq 0,01$; tabla 20). En el muestreo inicial, el recuento de microorganismos fue de 169000 para las parcelas testigo y 226667 para las tratadas. Sin embargo, en el final, las parcelas tratadas aumentaron el número de microorganismo llegando a 1142330, mientras que en las testigos estos aumentan a 342000, tal y como se observa en la figura 16.

- Poblaciones fijadoras de Nitrógeno

En esta ocasión, los tres factores presentan un efecto significativamente estadístico con un nivel de confianza del 99,9% para las poblaciones fijadoras de nitrógeno. Se puede observar en la figura 17 las parcelas testigos y las tratadas en el muestreo final, han incrementado la población fijadora de nitrógeno respecto a la muestra inicial. No obstante, este incremento es superior en las parcelas tratadas ($p \leq 0,001$; tabla 20).

- Solubilización de fósforo inorgánico.

La solubilización de fósforo inorgánico solo muestra significancia estadística para el factor muestreo y la interacción muestreo por tratamiento ($p \leq 0,0001$; tabla 20). En la figura 18 se observa como en el muestreo inicial, la solubilización en las parcelas testigo es el doble que en las parcelas tratadas y en el segundo muestreo, la solubilización de fósforo disminuye para ambas parcelas, más en las parcelas testigo que en las tratadas.

El tratamiento no ha influido significativamente ($p \leq 0,05$) en la interacción de los factores muestreo y tratamiento sobre los parámetros: fijación de nitrógeno, mineralización de fósforo orgánico, movilización de potasio, producción de sideróforos y proteasas.

Tabla 20. Evolución a nivel microbiológico de las capacidades PGP atribuidas al producto MICROPULL en la finca Experimental 2. Valores medios de 6 repeticiones

		TSA (UFC/g)	Poblaciones Fijadoras N (UFC/g)	Fijación de nitrógeno (%)	Solubilización P inorgánico (mm2)	Mineralización P orgánico (mm2)	Movilización de K (mm2)	Producción de sideróforos (mm2)	Producción de proteasas (mm2)
Muestreo (M)									
	Muestreo 1	197833 b	288833 b	1 b	679,10 a	1720,54 a	2038,89 a	629,36	781,72 b
	Muestreo 2	742167 a	3755000 a	1,73 a	261,79 b	1192,23 b	630,935 b	586,31	1981,3 a
Tratamiento (T)									
	Testigo	255500 b	1464330 b	1,55	503,17	1206,37 b	1054 b	403,577 b	1306,38 a
	Tratamiento	684500 a	2579500 a	1,19	437,72	1706,41 a	1615,83 a	812,102 a	1456,71 a
% suma de cuadrados									
M		39,92 **	81,75 ***	49,51 **	58,22 ***	36,21*	76,16 ***	0,86 n.s.	86,42 ***
T		24,79 **	8,46 ***	12,09 n.s	1,43 n.s	32,44*	12,12 *	77,88 ***	1,35 n.s.
M * T		18,57 **	7,66 ***	10,36 n.s.	31,79 ***	1,67 n.s	2,27 n.s.	2,81 n.s.	1,86 n.s.
Residual		16,70	2,11	28,02	8,54	29,66	9,43	18,44	10,34
<p>En la tabla se observa, en la parte superior, las medias por mínimos cuadrados con un intervalo de confianza del 95% para los dos efectos principales: M: Muestreo, tomando los datos respectivos al muestreo 1 (antes de la aplicación del tratamiento) y muestreo 2 (después de la aplicación del tratamiento). T: Tratamiento, corresponde a los datos relativos al control y al tratado. En la parte inferior, se muestra el % de suma de cuadrados, indicando que factor (M, T o M*T) es significativo estadísticamente en cada parámetro. N.s: no significativo. *p<0,05. **p< 0,001 **p<0,0001.</p>									

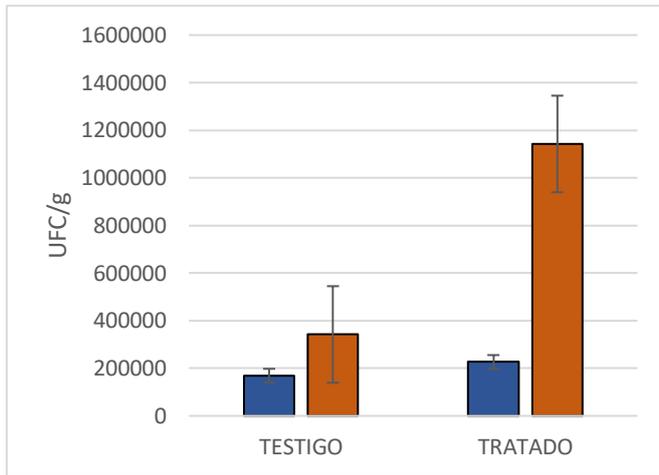


Figura 12. Poblaciones microbianas generales UFC (unidades formadoras de colonias) g⁻¹. Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.

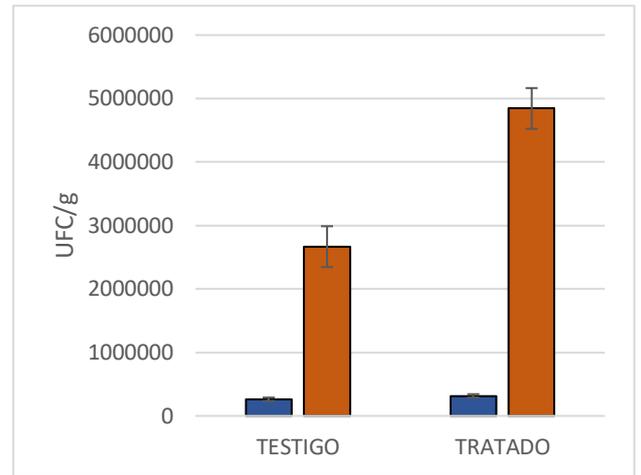


Figura 13. Poblaciones fijadoras de nitrógeno UFC (unidades formadoras de colonias) g⁻¹. Determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.

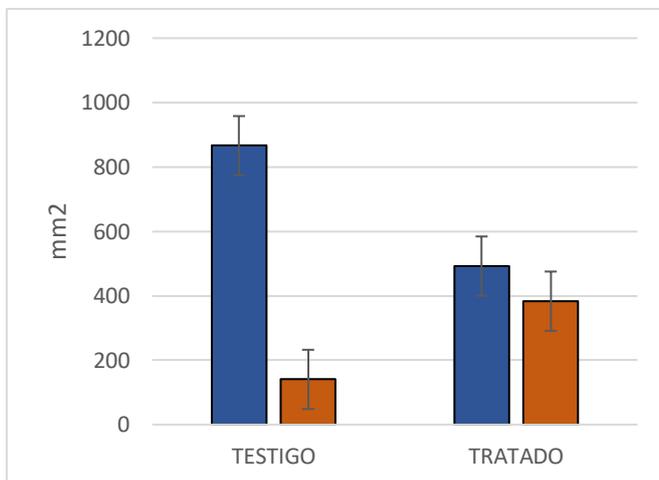


Figura 14. Solubilización de fósforo inorgánico mm², determinadas al inicio y al final del tratamiento con Micropull.