



**Desarrollo de un biofertilizante a base de biochar y bacterias fosfato solubilizadoras
para el cultivo de *Allium cepa* L.**

Estudiante

Yully Andrea Blanco-Vargas, Microb. Ind., M.Sc., Cand. Dr.

Directora

Aura M. Pedroza-Rodríguez, Bact., M.Sc., Ph.D.

Co directores

Lucía A. Díaz-Ariza, Microb., M.Sc.

Raúl A. Poutou-Piñales, Bq., M.Sc., Ph.D.

Trabajo de grado para optar al título de

Doctora en Ciencias Biológicas

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Doctorado en Ciencias Biológicas
Bogotá D.C.,
2020**

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1996

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**Desarrollo de un biofertilizante a base de biochar y bacterias fosfato solubilizadoras
para el cultivo de *Allium cepa* L.**


Yully Andrea Blanco-Vargas, Microb. Ind., M.Sc., Cand. Dr.

Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA)

Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI)

Grupo de Agricultura Biológica

APROBADO



Aura M. Pedroza-Rodríguez, Bact., M.Sc., Ph.D.

Directora



Lucía A. Díaz-Ariza, Microb., M.Sc.

Codirectora



Raúl A. Poutou-Piñales, Bq., M.Sc., Ph.D.

Codirector

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Doctorado en Ciencias Biológicas
Bogotá D.C.,
2020**

**Desarrollo de un biofertilizante a base de biochar y bacterias fosfato solubilizadoras
para el cultivo de *Allium cepa* L.**

Yully Andrea Blanco-Vargas, Microb. Ind., M.Sc., Cand. Dr.

Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA)

Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI)

Grupo de Agricultura Biológica

APROBADO



Balkys E. Quevedo Hidalgo, Ing.Q., M.Sc., Ph.D.

Jurado 1



Alejandro Pérez Flórez, M.Sc., Ph.D.

Jurado 2



Oswaldo A. Ramos Monroy, M.Sc., Ph.D.

Jurado 3



Mauricio Dutra Costa, M.Sc., Ph.D.

Jurado 4



Rodrigo A. Ortega Blu, M.Sc., Ph.D.

Jurado 5

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Doctorado en Ciencias Biológicas
Bogotá D.C.,
2020**

**Desarrollo de un biofertilizante a base de biochar y bacterias fosfato solubilizadoras
para el cultivo de *Allium cepa* L.**

Yully Andrea Blanco-Vargas, Microb. Ind., M.Sc., Cand. Dr.

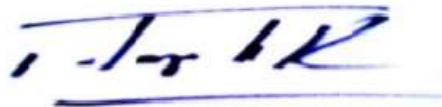
Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA)
Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI)
Grupo de Agricultura Biológica

APROBADO



Concepción J. Puerta B., Bact., Ph.D.

Decana Facultad de Ciencias



Alba Alicia Trespalacios R., Bact., M.Sc., Ph.D.

Directora de Posgrado

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Doctorado en Ciencias Biológicas
Bogotá D.C.,
2020**

A la memoria de mi madre.

A mi familia.

Agradecimientos

A la profesora Aura Pedroza por su dedicación, tiempo, enseñanzas, constancia, aportes, por su infinita paciencia, por la confianza, por sus consejos, por ser mi guía y por ayudarme a formar como profesional y persona.

Al profesor Raúl Poutou por su acompañamiento, enseñanzas, aportes y por estar siempre disponible para ayudarme.

A la profesora Lucia Ana por sus enseñanzas, asesoría y aportes a esta investigación.

A la profesora Viviana Gutiérrez por la asesoría, aportes al proyecto y por el préstamo del equipo para la realización del muestreo georreferenciado.

A la Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) y Grupo de Investigaciones en Agricultura Biológica, de la Facultad de Ciencias de la *Pontificia Universidad Javeriana* por permitirme desarrollar este proyecto.

A la Gobernación de Boyacá, Convocatoria 733 de 2015 de Colciencias: “*Formación de capital humano de alto nivel para el departamento de Boyacá*” y a la “*Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, D.C. Colombia*”, por la financiación de la investigación. A través del proyecto titulado “Desarrollo de un biofertilizante a base de biochar y bacterias fosfato solubilizadoras para el cultivo de *Allium cepa* L.” ID 00008626.

A la “*Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, D.C. Colombia*”, por la financiación de una parte de la investigación. A través del proyecto titulado “Uso combinado de hongos ligninolíticos y pirólisis para la obtención de biochar modificado empleando el modelo de bioferinería”. ID: 00007681.

A Lina Rodríguez, Natalia Sánchez, Laura Herrera, María Chacón, Paula Salej, por hacer parte de esta investigación a través de la realización de sus tesis de pregrado, las cuales aportaron parte de los resultados de esta investigación.

A todos los coautores de los artículos científicos producto de esta investigación por su participación y valiosos aportes para las publicaciones.

A la profesora Laura Castillo por su disposición para ayudarme, por la confianza, por recibirme en la “*Universidad Anáhuac – México*” y permitirme desarrollar la pasantía internacional, durante la cual se obtuvieron resultados que forman parte de esta investigación. A Daniel Toledo de la misma Universidad por su disposición, dedicación, amistad y sus por sus valiosos aportes.

A la “*Universidad Anáhuac - México*” por abrirme las puertas y recibirme en sus instalaciones para el desarrollo de la pasantía. Convenio de cooperación N° 04861-18 entre la “*Pontificia Universidad Javeriana - Bogotá, Colombia*” y la “*Universidad Anáhuac de México*”.

Al profesor Carlos Devia de la Facultad de Estudios Ambientales y Rurales por la colaboración y aportes para realizar el ensayo del biofertilizante en materas.

Al profesor Christiano Matos por la asesoría en la estadística del experimento del biofertilizante en materas.

Al Ing. Wilmar Olaya por la asesoría en el ensayo del biofertilizante en materas.

Al señor Gabriel Arguello, por el apoyo para contactar con los agricultores, por la donación del fertilizante Abundagro® y por su disposición para trabajar en esta investigación.

Al Doctor Cesar López por su disponibilidad, por el permiso para muestreo y por la donación de suelo de su finca en Punta Larga - Boyacá para realizar la evaluación del biofertilizante en materas.

Al señor Paulino Pérez, por el permiso para el muestreo de suelo de su finca en Pesca - Boyacá.

Al señor Ferney Viancha por la donación de semillas de *Allium cepa* L. y por el préstamo del terreno para la evaluación del bioinoculante en parcela.

Abreviaturas

AB: altura del bulbo

ANOVA: análisis de varianza

APC: aserrín de pino caribe

BC: biochar

BPS: bacterias fosfato solubilizadoras

BC/BPS: biofertilizante

BT: bacterias totales

CE: conductividad eléctrica

CS: cultivo secundario

CF: carbón fijo

CIC: capacidad de intercambio catiónico

COT: carbono orgánico total

CV: coeficiente de variación

DB: diámetro del bulbo

EDS: espectroscopía de rayos X de energía dispersa

FTIR: espectroscopía infrarroja transformada por Fourier (por sus siglas en inglés: *Fourier transform infrared spectroscopy*)

GDH: glucosa deshidrogenasa

IS: índice de solubilización

LR: longitud de la raíz

MO: materia orgánica

NH: número de hojas

PB: Plackett-Burman

PC: punto central

PCZ: punto de carga cero

PE: fósforo extractable

PFB: peso fresco del bulbo

PFH: peso fresco de las hojas

PFR: peso fresco de la raíz

PFT: peso fresco total
pH: potencial de hidrógeno
P_i: fósforo inorgánico
P_o: fósforo orgánico
PS: fósforo soluble
PSB: peso seco del bulbo
PSH: peso seco de las hojas
PSR: peso seco de la raíz
PST: peso seco total
PT: fósforo total
RP: roca fosfórica
MEB: microscopía electrónica de barrido
UFC: unidades formadoras de colonia
UP: unidad fosfatasa
VET: volumen efectivo de trabajo
VC: carbono volátil (por sus siglas en inglés: *volatile carbon*)

Capítulo 1.

Descripción general de la tesis

Tabla de contenido

1.1.	Introducción	13
1.2.	Planteamiento del problema y justificación	15
1.3.	Objetivo general	18
1.3.1.	Objetivos específicos.....	18
1.4.	Contexto general de la metodología	19

1.1. Introducción

El fósforo (P) es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas y su deficiencia en el suelo disminuye la productividad de los cultivos [1–3]. Los suelos agrícolas de algunas zonas del Departamento de Boyacá, Colombia, requieren la aplicación de P ya que presentan déficit o concentraciones bajas de este elemento, por lo cual el P debe ser incorporado al agro-ecosistema usando fertilizantes orgánicos e inorgánicos [4,5]. En los últimos años se ha incrementado sustancialmente la explotación industrial de minerales como la roca fosfórica (RP) para la fertilización de cultivos, ya que está compuesta por uno o más minerales fosfatados, que son utilizados generalmente como fuente de fosfato de calcio en la producción de fertilizantes químicos los cuales están diseñados para complementar los nutrientes presentes en el suelo, donde aproximadamente el 70 % del fósforo aplicado se convierte rápidamente en complejos insolubles; aumentado los costos para los productores, debido a que en la mayoría de los casos no se tienen en cuenta criterios técnicos para establecer planes de fertilización de acuerdo con un balance de nutrientes previo a la siembra y los requerimientos nutricionales de la especie vegetal [4,6–8]. Algunas bacterias tienen la capacidad de solubilizar minerales fosfatados como el fosfato tricálcico, el fosfato dicálcico, la hidroxiapatita; haciendo disponible el P contenido en estos, lo que incide positivamente en la productividad de las plantas [9]. Estos microorganismos solubilizan el P_i insoluble y mineralizan el P orgánico a través de diferentes mecanismos como la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular que provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular como carbohidratos, lípidos y péptidos (ácido glucónico, cítrico, succínico, oxálico, málico, láctico, entre otros) y enzimas fosfatasas ácidas (E.C. 3.1.3.2) y alcalinas (E.C. 3.1.3.1) [9–11].

Debido a que la tasa de supervivencia de las bacterias después de ser introducidas en el suelo disminuye, se necesita un soporte orgánico que garantice la supervivencia de las bacterias inoculadas [3,12]. Como soporte para la inmovilización de microorganismos, algunos autores han estudiado el BC, producido a partir de residuos lignocelulósicos como el aserrín [13], ya que presenta ventajas, entre las que destacan, poseer un alto contenido de C condensado, el área superficial y los macroporos y microporos en donde las bacterias pueden estar protegidas de las condiciones ambientales adversas y así facilitar su supervivencia, lo fácilmente disponibles y es un material de partida económico en términos de producción [14–16]. El BC es un carbón de grano fino, rico en carbono orgánico condensado, producido por medio de un proceso de

conversión térmica o también denominado pirólisis. El cuál se puede realizar bajo ausencia o limitación de oxígeno, es altamente poroso, tiene un área superficial amplia y frecuentemente, presenta carga superficial positiva que se asocia con la capacidad de adsorción de bacterias que presentan carga superficial negativa en la pared [17–20]. El BC tiene efectos positivos en la calidad del suelo, a través de la retención de la humedad, aumento del pH, mejoramiento de la estructura del suelo y estimulación de la actividad microbiana; lo que finalmente conduce a la promoción del crecimiento de la planta [21–23]. Por lo tanto, la aplicación de un biofertilizante compuesto por BC y BPS en cultivos de *A. cepa* L., puede ser una estrategia de mejora de la actividad de las BPS en el suelo; generando mayor solubilización de P para aumentar la productividad en el cultivo y adicionalmente es una estrategia amigable con el medio ambiente [14].

Por tal razón, en la primera parte de esta investigación se produjo un bioinoculante a base de BPS productoras de ácidos orgánicos y fosfatasa en medio MT11B cuya fuente de P fue la RP para probar su efecto en el cultivo de cebolla cabezona (*Allium cepa* L.), con la finalidad de incrementar la disponibilidad de P soluble en el suelo. Sin embargo, a pesar de los beneficios agronómicos que proporcionan las BPS, deben competir en el suelo con otros microorganismos y por esta razón en la segunda parte de este trabajo se produjo un BC de aserrín de pino con la finalidad de usarlo como soporte orgánico o matriz sólida para ayudar a mantener la viabilidad de las BPS que solubilizan P a partir de la RP contenida en el medio de cultivo. Finalmente, en la tercera parte de esta investigación se evaluó el efecto del biofertilizante compuesto por BPS y BC en el cultivo de *A. cepa* L.

1.2. Planteamiento del problema y justificación

Boyacá es un Departamento de Colombia con vocación agrícola por la fertilidad de sus suelos y la diversidad climática. El sector agropecuario ha sido uno de los motores principales del desarrollo económico Colombiano y el mayor generador de empleo en el país (19 %), lo que ha generado la reactivación del sector en los últimos años [4]. De acuerdo con los datos suministrados por la Secretaría de Fomento Agropecuario de Boyacá (2009), dentro de las 33 especies de hortalizas producidas en mayor volumen en el departamento, se encuentran el tomate (29 %), la cebolla cabezona (17 %), la zanahoria (16 %), la cebolla larga (9 %) y el repollo (6 %), que concentran en conjunto el 77 % de la producción total [24]. Según la Encuesta Nacional Agropecuaria, durante el año 2015 en Colombia se obtuvo una producción de 196.920 toneladas de cebolla cabezona (*Allium cepa* L.), con rendimientos promedios de 21,4 ton ha⁻¹ al año; siendo el Departamento de Boyacá el principal productor con 107.567 toneladas [25]. Debido a la importancia que ha adquirido este cultivo, es necesario (en términos técnicos) el manejo adecuado de la fertilización, ya que se reflejaría directamente en beneficios tanto económicos como edafológicos para el Departamento [4].

El fósforo (P) es uno de los nutrientes principales que limita el crecimiento de *A. cepa* L. El P presente en los suelos se encuentra formando complejos con cationes por lo cual no está en forma soluble para ser asimilado [26]. El P es tomado por las plantas en forma de iones H₂PO₄⁻ y HPO₄⁼ y es un elemento poco móvil en el suelo [27]. Para la fertilización de los cultivos, se requiere de la aplicación de altas dosis de fertilizantes de síntesis química, que se obtiene a partir de RP, razón por la cual se ha incrementado sustancialmente la explotación de los yacimientos de ésta (minerales ricos en RP ya que está compuesta por uno o más minerales fosfatados, con la suficiente pureza para ser explotados económicamente y se utilizan como fuente de fosfato de calcio y fósforo para la producción de fertilizantes artificiales) [4]. Colombia tiene un alto potencial como productor de RP; siendo importantes las minas presentes en el Departamento de Boyacá, donde al parecer se han encontrado yacimientos de fosforita en los municipios de Sogamoso, Cuítiva, Iza, Nuevo Colón, Pesca, Tota y Turmequé [4]. La RP de Pesca (Boyacá), ha sido clasificada como de reactividad intermedia, lo que promueve que se trate de incrementar su utilidad agronómica, empleándola como fuente de fósforo para las BPS [28]. Desafortunadamente, el P proveniente de la RP no está disponible para las plantas en suelos con pH ácidos o alcalinos, pues la fijación y precipitación de P en el suelo es altamente dependiente

del pH y del tipo de suelo, causando una baja eficiencia de los fertilizantes de fósforo soluble [29]. En suelos ácidos los óxidos libres y los hidróxidos de Al^{+3} y Fe^{+3} fijan el P, mientras que en suelos alcalinos el P es fijado por Ca^{+2} y Mg^{+2} [30,31]. Por esta razón, los agricultores dudan en utilizar RP directamente en los cultivos. Una alternativa para proporcionar formas de P disponibles a partir de la RP es a través del uso de BPS, las cuales por medio de mecanismos como la producción de ácidos orgánicos, fosfatasas, reacciones de quelación e intercambio iónico, son capaces de liberar formas disponibles de P para ponerlas a disposición de las plantas [29]. Las BPS pueden emplearse en presentaciones líquidas o formuladas en diferentes tipos de materiales, siempre y cuando se mantenga su viabilidad, concentración y actividad biológica, para que puedan sobrevivir al ser aplicadas a suelos, en donde la densidad poblacional de otros microorganismos es alta y podría llegar a afectar su desempeño [32,33]. En consecuencia, el uso de BPS en la práctica agrícola no sólo compensaría el alto costo de la fabricación de fertilizantes fosfatados, sino que también movilizaría fertilizantes insolubles en los suelos a los que se apliquen [34].

Por otra parte, la producción de residuos lignocelulósicos como el aserrín, la corteza y la viruta provenientes del aprovechamiento comercial de árboles maderables, se depositan inapropiadamente cerca de las ciudades o en áreas rurales, lo que resulta en material potencialmente contaminante; generando impactos ambientales como la inmovilización de nutrientes y enzimas en el suelo [35]. Estos residuos sólidos orgánicos presentan degradación lenta dado que tiene un alto contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa. Polímeros estructurales complejos, resistentes e hidrofóbicos, lo cual hace difícil su transformación biológica [36,37]. Si bien el uso de estos subproductos agroindustriales crudos o parcialmente transformados es generalizada a nivel mundial, una alternativa adicional de aprovechamiento es la conversión térmica o pirólisis para la producción de BC que se obtiene bajo condiciones reducidas o en ausencia de oxígeno, de la biomasa lignocelulósica [38]. El BC, al ser un carbón altamente condensado y estable, es utilizado exitosamente en agricultura como enmienda orgánica, ya que presenta características como una alta densidad de carga y una gran área superficial, lo que le confiere la capacidad para retener agua y nutrientes; favoreciendo la capacidad de intercambio de cationes, la estabilidad estructural del suelo, la porosidad, la permeabilidad y la aireación del mismo [39,40]. Otra de las ventajas que presenta el uso de BC es que, al soportar microorganismos, ofrece un nicho favorable para las BPS, mejorando de esta

forma la disponibilidad de P en el suelo [14,41,42], permitiéndoles alcanzar velocidades de crecimiento elevadas, poblaciones altas y protección frente a factores ambientales adversos [19,42–45]. Por lo anterior, se puede potenciar el uso del BC al emplearlo como soporte orgánico o matriz sólida para la inmovilización, formulación o coinoculación de BPS y de esta manera producir un biomaterial que sirve como soporte bacteriano manteniendo la densidad poblacional por la adsorción y retención de las bacterias en los macro y/o microporos, así como acondicionador de suelo, mejorando las propiedades fisicoquímicas y la fertilidad del mismo [14,46–48].

1.3. Objetivo general

Desarrollar un biofertilizante a base de biochar (BC) y bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) para el cultivo de *Allium cepa* L. (cebolla de bulbo).

1.3.1. Objetivos específicos

- Desarrollar un bioinoculante a base bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) productoras de ácidos orgánicos y fosfatasas.
- Producir y caracterizar un biochar (BC) a base de residuos de aserrín, empleando transformación térmica a bajas temperaturas para la obtención de un portador para el bioinoculante.
- Evaluar el efecto del biofertilizante en *Allium cepa* L.

1.4. Contexto general de la metodología

La tesis doctoral se articuló a través de tres capítulos, en cada uno de ellos se realizaron diferentes actividades metodológicas, que permitieron el cumplimiento de cada uno de los objetivos específicos.

Fase I: Se aislaron bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) productoras de ácidos orgánicos y fosfatasas a partir de suelos en los que se cultiva de *Allium cepa* L. Se realizó la selección de tres BPS empleando las pruebas de índice de solubilización en agar SMRS1-RP, interacciones por la técnica de Gauze modificada, solubilización de P de RP en medio líquido (individualmente y en cocultivos y consorcio) e identificación molecular por amplificación de la subunidad 16S ribosomal. Posteriormente se determinaron los componentes y las condiciones de cultivo que favorecen la producción de las BPS seleccionadas, empleando un diseño experimental Plakett-Burman para la producción de un medio de cultivo que contiene una baja concentración de RP de Pesca Boyacá, como fuente inorgánica de fósforo para las BPS ($2,5 \text{ g L}^{-1}$). Adicionalmente, se determinaron los parámetros cinéticos de producción y se realizó la caracterización del bioinoculante. En esta última actividad, relacionada con la caracterización química y microbiológica del bioinoculante, que incluyó actividades relacionadas con el recuento de BPS totales y por morfotipo, la determinación de la actividad fosfatasa, la detección y cuantificación de los ácidos orgánicos producidos por las BPS individualmente y en cocultivo y consorcio, la observación de la morfología y las características superficiales de la RP antes del cultivo y de la RP con BPS y las pruebas de estabilidad de la biomasa del bioinoculante a diferentes temperaturas y pH.

Fase II: Como biomasa lignocelulósica de partida o materia prima se utilizó aserrín de pino (*Pinus caribaea*), a este material se le realizó la caracterización física y química, para conocer sus propiedades iniciales. La selección de las condiciones de producción del BC se determinaron a través de un diseño factorial 2^3 y se realizaron análisis especializados como análisis próximo, análisis elemental espectroscopía infrarrojo, microscopía electrónica de barrido, formulación de las BPS en el BC, estudios de adsorción y estudios de estabilidad o viabilidad de las BPS en función del tiempo. Adicionalmente, se realizó un estudio paralelo en el cual se empleó corteza de pino como materia prima para la producción de otro tipo de BC, el cual también se utilizó

para inmovilizar las BPS y realizar los primeros estudios preliminares a escala de laboratorio e invernadero, del efecto del BC y las BPS en la germinación y crecimiento de semillas de *Allium cepa* L.

Fase III: Esta fase se desarrolló en dos etapas. La primera relacionada con la evaluación del efecto del bioinoculante sobre la germinación de semillas de *Allium cepa* L., y a escala de invernadero y campo. Para ello, primero se determinó el porcentaje de germinación de semillas de *A. cepa* L., en cámara húmeda en laboratorio por un período de 5 días usando las cepas por separado, en consorcio y cocultivo para verificar que las BPS no ejercieran efecto inhibitorio sobre la germinación. Posteriormente se evaluó el efecto del bioinoculante sobre el crecimiento de *A. cepa* L. en invernadero, durante dos meses, empleando suelo agrícola estéril proveniente del Departamento de Boyacá en el que se cultiva esta especie vegetal.

Para la evaluación del bioinoculante en campo se empleó el fertilizante comercial Abundagro[®] de origen orgánico mineral con BPS y sin BPS en el municipio de Tópaga (Boyacá, Colombia) en suelo donde se cultiva cebolla cabezona. Para desarrollar este experimento, se tomaron plántulas de 2 meses de edad obtenidas a partir de semilleros establecidos con *A. cepa* L., y se trasladaron directamente en el suelo para ser evaluadas durante 5 meses. Se evaluaron varios tratamientos que comprendían diferentes dosis de fertilización de Abundagro[®] con y sin BPS. La fertilización se aplicó fraccionada en concentraciones iguales en tres momentos: al momento del trasplante, un mes después del trasplante y dos meses después del trasplante. Las variables respuesta evaluadas fueron altura del bulbo (AB) (cm), el diámetro del bulbo (DB) (cm), peso seco del bulbo (PSB) (g).

En la segunda parte de la fase III se evaluó el efecto del biofertilizante compuesto por BC y BPS (BC/BPS) sobre el crecimiento de *A. cepa* L. en materas. Para ello se empleó suelo agrícola estéril proveniente del Departamento de Boyacá, de uno de los terrenos de donde fueron aisladas algunas de las BPS de esta investigación. Para desarrollar este experimento, se tomaron plántulas de 20 días de edad, obtenidas a partir de un semillero establecido previamente en turba Impulse semillas[®] y se trasladaron directamente en a las materas para ser evaluadas durante 4 meses. Se valoraron 6 tratamientos que comprendían diferentes dosis de fertilización de BC con y sin BPS. La fertilización base se aplicó en dosis única al momento del trasplante. Las variables

respuesta fueron peso fresco del bulbo (PFB) (mg), diámetro del bulbo (DB) (mm), altura del bulbo (AB) (mm), peso fresco de la raíz (PFR) (mg), longitud de la raíz (LR) (mm), peso fresco de las hojas (PFH) (mg), número de hojas (NH), peso seco del bulbo (PSB) (mg), peso seco de la raíz (PSR), peso seco de las hojas (PSH).

1.5. Referencias

1. Paul D, Sankar NS. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science*. 2017;15: 130–136. doi:10.1016/j.aasci.2016.10.001
2. Mukhtar S, Shahid I, Mehnaz S, Malik KA. Assessment of two **carrier** materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Microbiological Research*. 2017;205: 107–117. doi:10.1016/J.MICRES.2017.08.011
3. Lobo CB, Juárez Tomás MS, Viruel E, Ferrero MA, Lucca ME. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*. 2019;219: 12–25. doi:10.1016/j.micres.2018.10.012
4. Ruiz CF, Henao Gómez D, Lozano Borda M, Colorado LA, Mora Holguin H, Velandia Sanchez J, et al. Plan estratégico departamental de Ciencia, Tecnología e Innovación - PEDCTI Boyaca. Primera ed. Tunja; 2012.
5. Munda S, Shivakumar BG, Rana DS, Gangaiah B, Manjaiah KM, Dass A, et al. Inorganic phosphorus along with biofertilizers improves profitability and sustainability in soybean (*Glycine max*)-potato (*Solanum tuberosum*) cropping system Production and hosting by Elsevier. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2018;17: 107–113. doi:10.1016/j.jssas.2016.01.008
6. Calle Castañeda SM, Márquez Godoy MA, Hernández Ortiz JP. Solubilization of phosphorus from phosphate rocks with *Acidithiobacillus thiooxidans* following a growing-then-recovery process. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018;34: 1–10. doi:10.1007/s11274-017-2390-7
7. Restrepo-Franco GM, Marulanda-Moreno S, De la Fe-Pérez Y, Díaz-De la Osa A, Lucia-Baldani V, Hernández-Rodríguez A. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2015;46: 63–76.
8. Guerrero R. Fertilización de cultivos en clima frío. Segunda ed. Barranquilla, Colombia: Sáenz y Cia Ltda; 1998.
9. Wei Y, Zhao Y, Shi M, Cao Z, Lu Q, Yang T, et al. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*. 2018;247: 190–199. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.092
10. Behera BC, Yadav H, Singh SK, Mishra RR, Sethi BK, Dutta SK, et al. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15: 169–178. doi:10.1016/j.jgeb.2017.01.003

11. Behera Chandra B, Yadav H, Singh SK, Sethi BK, Mishra RR, Kumari S, et al. Alkaline phosphatase activity of a phosphate solubilizing *Alcaligenes faecalis*, isolated from Mangrove soil. *Biotechnology Research and Innovation*. 2017; 101–111. doi:10.1016/j.biori.2017.01.003
12. Blanco-Vargas A, Rodriguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Garzon-Jaramillo R, Rivera-Hoyos CM, Díaz-Ariza LA, et al. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Helijon*. 2020a;6: e05218. doi:10.1016/j.helijon.2020.e05218
13. Diaz LA, Morales Palencia LM, Beltran Acosta JS. Inoculante biológico para la promoción de crecimiento de las especies forestales y método para su obtención. Colombia; WO 2014/167409 A1, 2014. p. 36.
14. Siddiqui AR, Nazeer S, Piracha MA, Saleem MM, Siddiqui I, Shahzad SM, et al. The production of biochar and its possible effects on soil properties and phosphate solubilizing bacteria. *Journal of Arid Agriculture and Biotechnology*. 2016;1: 27–40. doi:2415-6736
15. Awad YM, Ok YS, Abridgata J, Beiyan J, Beckers F, Tsang DCW, et al. Pine sawdust biomass and biochars at different pyrolysis temperatures change soil redox processes. *Science of the Total Environment*. 2018;625: 147–154. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.194
16. Luo L, Xu C, Chen Z, Zhang S. Properties of biomass-derived biochars: Combined effects of operating conditions and biomass types. *Bioresource Technology*. 2015;192: 83–89. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.054
17. Anderson CR, Condrón LM, Clough TJ, Fiers M, Stewart A, Hill RA, et al. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. *Pedobiologia*. 2011;54: 309–320. doi:10.1016/j.pedobi.2011.07.005
18. Chen S, Qi G, Ma G, Zhao X. Biochar amendment controlled bacterial wilt through changing soil chemical properties and microbial community. *Microbiological Research*. 2020;231. doi:10.1016/j.micres.2019.126373
19. Egamberdieva D, Wirth S, Behrendt U, Abd-Allah EF, Berg G. Biochar treatment resulted in a combined effect on soybean growth promotion and a shift in plant growth promoting rhizobacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00209
20. Kavitha B, Laxma Reddy PV, Kim B, Lee SS, Pandey SK, Kim KH. Benefits and limitations of biochar amendment in agricultural soils: A review. *Journal of Environmental Management*. 2018;227: 146–154. doi:10.1016/j.jenvman.2018.08.082
21. Steinbeiss S, Gleixner G, Antonietti M. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 2009;41: 1301–1310. doi:10.1016/j.soilbio.2009.03.016
22. Beheshti M, Etesami H, Alikhani HA. Interaction study of biochar with phosphate-

- solubilizing bacterium on phosphorus availability in calcareous soil. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 2017. doi:10.1080/03650340.2017.1295138
23. Lehmann J, Rillig MC, Thies J, Masiello CA, Hockaday WC, Crowley D. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biology and Biochemistry*. 2011;43: 1812–1836. doi:10.1016/j.soilbio.2011.04.022
 24. Boyaca G de, Agricultura S de. Plan Departamental De Extensión Agropecuaria - PDEA. Tunja (Boyaca); 2019. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 25. DANE. Boletín mensual: Isumos y factores asociados a la producción agropecuaria. 2016.
 26. Adhikary H, Sanghavi PB, Macwan SR, Archana G, Kumar NG. Artificial citrate operon confers mineral phosphate solubilization ability to diverse fluorescent pseudomonads. *Plos one*. 2014;9: 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0107554
 27. Borno ML, Müller-Stöver DS, Liu F. Contrasting effects of biochar on phosphorus dynamics and bioavailability in different soil types. *Science of the Total Environment*. 2018;627: 963–974. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.01.283
 28. Richardson AE, Simpson RJ. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiology*. 2011;156: 989–996. doi:10.1104/pp.111.175448
 29. Perez Lavalle L, Bolivar Anillo HJ, Diaz Perez A. Biofertilizantes en Colombia. Productos de confiteria nutraceutica Una opcion empresarial para cultivadores de frutas y hortalizas. Barranquilla y Cucuta (Colombia): Universidad Simon Bolivar; 2018. pp. 179–222.
 30. Igual JM, Valverde A, Cervantes E, Velázquez E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*. 2001;21: 561–568. doi:10.1051/agro:2001145
 31. Karlicic V, Radic D, Jovicic-Petrovic J, Lalevic B, Jovanovic L, Kikovic D, et al. Isolation and characterization of bacteria and yeasts from contaminated soil. *Journal of Agricultural Sciences*. 2016;61: 247–256. doi:10.2298/jas1603247k
 32. Blanco-Vargas A, Rodriguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, Diaz-Ariza LA, et al. Bio-inoculant Production Composed by *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., and *Kosakonia* sp.: Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on *Allium cepa* L. growth at Plot Scale. *Universitas Scientiarum*. 2020b. doi:Under review
 33. Vassilev N, Vassileva M, Fenice M, Federici F. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Bioresource Technology*. 2001;79: 263–271. doi:10.1016/S0960-8524(01)00017-7
 34. Kaur G, Reddy MS. Effects of Phosphate-Solubilizing Bacteria, Rock Phosphate and Chemical Fertilizers on Maize-Wheat Cropping. *Pedosphere: An International Journal*. 2015;25: 428–437. doi:10.1016/S1002-0160(15)30010-2
 35. Barros DL, Rezende FA, Campos AT, Maia CMBF. Biochar of Sawdust Origin in Passion

- Fruit Seedling Production. *Journal of Agricultural Science*. 2017;9: 200. doi:10.5539/jas.v9n5p200
36. Collard FX, Blin J. A review on pyrolysis of biomass constituents: Mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014;38: 594–608. doi:10.1016/j.rser.2014.06.013
 37. Brebu M, Vasile C. Thermal degradation of lignin - A review. *Cellulose Chemistry and Technology*. 2010;44: 353–363.
 38. Wang Y, Xie X, Chen X, Huang C, Yang S. Biochar loaded Ce³⁺-enriched ultra-fine ceria nanoparticles for phosphate adsorption. *Journal of Hazardous Materials*. 2020. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122626
 39. Kan T, Strezov V, Evans TJ. Lignocellulosic biomass pyrolysis: A review of product properties and effects of pyrolysis parameters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016;57: 1126–1140. doi:10.1016/j.rser.2015.12.185
 40. Kumar R, Strezov V, Weldekidan H, He J, Singh S, Kan T, et al. Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: A review of biomass pre-treatment methods for production of drop-in fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020;123: 109763. doi:10.1016/j.rser.2020.109763
 41. Egamberdieva D, Reckling M, Wirth S. Biochar-based Bradyrhizobium inoculum improves growth of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) under drought stress. *European Journal of Soil Biology*. 2017;78: 38–42. doi:10.1016/j.ejsobi.2016.11.007
 42. Fox A, Kwapinski W, Griffiths BS, Schmalenberger A. The role of sulfur- and phosphorus-mobilizing bacteria in biochar-induced growth promotion of *Lolium perenne*. *FEMS Microbiology Ecology*. 2014;90: 78–91. doi:10.1111/1574-6941.12374
 43. Harel YM, Elad Y, Rav-David D, Borenstein M, Shulchani R, Lew B, et al. Biochar mediates systemic response of strawberry to foliar fungal pathogens. *Plant Soil*. 2012;357: 245–257. doi:10.1007/s11104-012-1129-3
 44. Mehari ZH, Elad Y, Rav-David D, Graber ER, Meller Harel Y. Induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Botrytis cinerea* by biochar amendment involves jasmonic acid signaling. *Plant Soil*. 2015;395: 31–44. doi:10.1007/s11104-015-2445-1
 45. Jaiswal AK, Frenkel O, Elad Y, Lew B, Graber ER. Non-monotonic influence of biochar dose on bean seedling growth and susceptibility to *Rhizoctonia solani*: the “Shifted Rmax-Effect.” *Plant Soil*. 2015;395: 125–140. doi:10.1007/s11104-014-2331-2
 46. Hale L, Luth M, Crowley D. Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. *Soil Biology and Biochemistry*. 2015;81: 228–235. doi:10.1016/j.soilbio.2014.11.023

47. Rafique M, Ortas I, Ahmed IAM, Rizwan M, Afridi MS, Sultan T, et al. Potential impact of biochar types and microbial inoculants on growth of onion plant in differently textured and phosphorus limited soils. *Journal of Environmental Management*. 2019;247: 672–680. doi:10.1016/j.jenvman.2019.06.123
48. Moreno-Bayona DA, Gómez-Méndez LD, Blanco-Vargas A, Castillo-Toro A, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, et al. Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by *Pleurotus ostreatus* for biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use. *PLoS ONE*. 2019;14: 25. doi:10.1371/journal.pone.0217100

Capítulo 2.
Marco Teórico

Tabla de contenido

2.1. Introducción	30
2.1.1. Ciclo del fósforo.....	30
2.1.1.1. Formas de fósforo en el suelo	31
2.1.1.1.1. P inorgánico.....	32
2.1.1.1.2. P orgánico.....	32
2.1.1.2. Mecanismos de solubilización de P	32
2.1.1.2.1. Producción de ácidos orgánicos para la solubilización de P.....	33
2.1.1.2.1.1. Ácido glucónico.....	34
2.1.1.2.2. Producción de fosfatasas para la mineralización de P.....	34
2.1.1.3. Factores que afectan la solubilización de P	35
2.1.1.3.1. pH	35
2.1.1.3.2. Relación C/N/P.....	36
2.1.1.3.3. Temperatura y humedad.....	36
2.1.2. Roca fosfórica.....	37
2.1.3. Bioinoculantes a base de BPS	38
2.1.3.1. Bacterias fosfato solubilizadoras (BPS).....	39
2.1.3.1.1. <i>Pseudomonas</i> spp.	40
2.1.3.1.2. <i>Serratia</i> spp.	41
2.1.3.1.3. <i>Kosakonia</i> spp.	41
2.1.4. Aprovechamiento de productos del aserrinaje para la producción de BC.....	42
2.1.5. Biochar (BC)	44
2.1.5.1. Definición	44
2.1.5.2. Factores que afectan la producción de BC.....	44
2.1.5.3. Propiedades físico químicas del BC.....	45
2.1.5.3.1. Materias primas	46
2.1.5.3.2. Efecto de la temperatura de pirólisis	46
2.1.5.3.3. Efecto del tiempo de residencia	47
2.1.5.3.4. Oxígeno.....	48
2.1.5.4. Usos y ventajas del biochar en suelo	48
2.1.6. Cebolla de bulbo <i>Allium cepa</i> L.....	49
2.1.6.1. Morfología <i>A. cepa</i> L.	50
2.1.6.1.1. Semilla.....	51
2.1.6.1.2. Hojas.....	51

2.1.6.1.3.	Tallo.....	51
2.1.6.1.4.	Bulbo	51
2.1.6.1.5.	Raíz	51
2.1.6.2.	Nutrientes en cebolla <i>A. cepa</i> L.	51
2.1.6.2.1.	Nitrógeno.....	52
2.1.6.2.2.	Fósforo.....	52
2.1.6.2.3.	Potasio.....	53
2.2.	Referencias.....	54

2.1. Introducción

2.1.1. Ciclo del fósforo

La productividad en suelos se obtiene al alcanzar contenidos óptimos de los elementos esenciales para el desarrollo vegetal. Entre los más importantes se encuentran el nitrógeno (N), el potasio (K) y el fósforo (P) ya que su deficiencia limita el crecimiento de plantas. El P es requerido en grandes cantidades para la transformación de la energía en el proceso de fotosíntesis y porque hace parte fundamental de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, vitaminas y fosfolípidos en las plantas [1–5]. En comparación con otros macronutrientes esenciales (con la excepción de N), el P es uno de los elementos menos abundantes en el ambiente y sólo el 0,1 % del P total existe en una forma soluble disponible para ser absorbido por las plantas [2,6–8]. El único estado biológicamente útil del fósforo, es la forma inorgánica que se encuentra en los minerales de fosfato y las concentraciones de fósforo disponibles para la planta en la solución del suelo son bajas ($<0,01$ a 1 mg L^{-1} en suelos altamente fértiles) debido al bajo contenido de P en el material original, pero también debido a la alta reactividad del P que resulta en una elevada retención en la matriz mineral del suelo [6,9,10].

En las prácticas agrícolas, los fertilizantes fosfatados se aplican intencionalmente al suelo de los cultivos para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, para ser el más efectivo, eficiente y ambientalmente favorable, los fertilizantes fosfatados deben permanecer disponibles cerca de la zona de las raíces para poder ser tomado por las plantas. Desafortunadamente, el P contenido en los fertilizantes se inmoviliza fácilmente y deja de estar disponible para las plantas, debido a la fuerte fijación en las soluciones del suelo [10–12]. Esto es especialmente crucial en suelos donde el P no está disponible debido a la formación de complejos con iones de Al^{+3} y Fe^{+3} en suelos ácidos y con Ca^{+2} y Mg^{+2} en suelos alcalinos [8,13–16]. Lo que conduce a la rápida formación de P no disponible para las plantas después de la aplicación de los fertilizantes [3,5]. La eficiencia en el uso de los fertilizantes fosfatados depende en gran medida de las propiedades del suelo. Las plantas dependen de la reposición continua de iones fosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) en la solución del suelo [13,16–18]. Por lo tanto, incluso si el P total del suelo es alto y también si los fertilizantes de P se aplican regularmente, la fijación química dependiente del pH y este mismo determina la cantidad de P extraíble [7]. La necesidad de P en la agricultura puede satisfacerse mediante la aplicación de fertilizantes químicos. Sin embargo, el uso excesivo de

fertilizantes puede causar impactos ambientales imprevistos, altos costos en la producción de cultivos, daño en la estructura, la composición y la microflora del suelo [19].

Una de las fuentes más comunes para suplir la deficiencia de P en el suelo es la roca fosfórica (RP) [3]. Colombia es un país privilegiado, ya que cuenta con importantes depósitos de RP, ubicados en los Departamentos de Boyacá, Huila, Norte de Santander y Cauca. En RP, el contenido de pentóxido de fósforo (P_2O_5) varía entre 20 y 30 % (p/v), [20]; sin embargo, a pesar de su alto contenido de fósforo, se encuentra como una forma no intercambiable con baja solubilidad a pH neutro y alcalino [4]. Dado que la demanda para mejorar la disponibilidad de fertilizantes fosfatados sigue aumentando, es importante encontrar tecnologías no convencionales que permitan aumentar la disponibilidad de P a partir de la RP [3,17]. Las bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) tienen la capacidad de aumentar la fertilidad del suelo, ayudando así a las plantas a obtener su nutrición del suelo y dando como resultado un mayor crecimiento al solubilizar el P inorgánico insoluble y mineralizar el P orgánico [21,22]. Las BPS pueden transformar el P insoluble en formas solubles mediante acidificación, quelación, reacciones de intercambio y formación de sustancias poliméricas, lo que está relacionado con la producción de ácidos orgánicos y la liberación de protones (H^+) para generar la movilización y transformación del P del suelo [17]. En el proceso de mineralización de P participan las enzimas fosfatasas, las cuales eliminan un grupo fosfato de su sustrato [23].

2.1.1.1. Formas de fósforo en el suelo

El P del suelo tiene dos orígenes: el P nativo, que se libera en la solución del suelo por la meteorización natural del material parental del suelo (minerales primarios), y el P heredado, resultado de aplicaciones pasadas de fertilizantes y abonos [10].

La forma química del P en el suelo es un regulador importante de la eficiencia de las BPS (solubilización/mineralización) para movilizar P unido en la fase sólida del suelo. Generalmente, las BPS se seleccionan por su capacidad para disolver RP *in vitro*; sin embargo, la RP puede no reflejar la forma de P que se encuentra en muchos suelos. Esta es probablemente una de las principales razones por las cuales las BPS muestran respuestas diferenciales *in situ* [6].

2.1.1.1.1. P inorgánico

En suelos neutros y ácidos, los óxidos e hidróxidos de Al^{3+} y Fe^{3+} ejercen un gran impacto en la disponibilidad de P, porque varios fosfatos de Fe^{3+} y Al^{3+} identificados, como wavellita ($\text{Al}_3(\text{OH})_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), variscita ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), strengita ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), generalmente son raros debido al aumento de la carga superficial positiva de los óxidos de Fe^{3+} y Al^{3+} , que con la disminución del pH, forman fuertes enlaces covalentes (quimisorción) con el P cargado negativamente, lo que lo hace bastante recalcitrante para las reacciones de intercambio. Sin embargo, los aniones orgánicos (por ejemplo, ácidos orgánicos) liberados por las BPS son capaces de competir con el P_i por los sitios de sorción generando la liberación de P soluble. Además, los cambios en el pH pueden afectar directa o indirectamente el potencial de superficie de los óxidos y, en consecuencia, la solubilidad del P_i [6,8].

2.1.1.1.2. P orgánico

La reserva orgánica de P aumenta con el desarrollo del suelo, pero tiende a disminuir nuevamente en suelos altamente degradados y antiguos. En consecuencia, el desarrollo del suelo y la distribución de P, así como la composición de las formas de P, tienen un gran impacto en la accesibilidad de P para los microorganismos, determinando el éxito de las BPS en el campo. Los principales compuestos de P_o identificados en el suelo son fosfatos de inositol, fosfolípidos y ácidos nucleicos provenientes de los microorganismos. Los fosfatos de inositol se caracterizan por una alta acidez y a menudo se encuentran como componentes de polímeros o complejos insolubles con proteínas y lípidos. Su estabilidad está estrechamente relacionada con el número de grupos fosfato [6,24].

2.1.1.2. Mecanismos de solubilización de P

La disponibilidad de fósforo inorgánico (P_i) en el suelo se rige principalmente por las propiedades de disolución de los minerales que contienen P (determinados en gran medida por el pH), así como por las reacciones de equilibrio de la solución (sorción y desorción) [25]. El P_i se encuentra en el suelo, principalmente en complejos minerales insolubles, algunos de ellos aparecen después de la aplicación de fertilizantes químicos. Estas formas precipitadas no pueden ser absorbidas por las plantas [26]. En contraste, la disponibilidad de P derivada de P_o se rige principalmente por la actividad microbiana (mineralización e hidrólisis enzimática) [6].

Las bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) y los microorganismos en general, tienen la capacidad de modificar su entorno químico inmediato a través de la absorción y liberación de iones y moléculas orgánicas e inorgánicas. Los principales mecanismos de solubilización de P empleados por los microorganismos del suelo incluyen: 1) La liberación de compuestos complejos o disolventes minerales como aniones ácidos orgánicos, sideróforos, protones, iones hidroxilo y CO₂, 2) Producción de enzimas extracelulares (mineralización de P_o) El P incorporado en la biomasa microbiana puede inmovilizarse temporalmente pero permanece en una forma biodisponible que puede liberarse a través de las BPS [6,17,27].

2.1.1.2.1. Producción de ácidos orgánicos para la solubilización de P

Los ácidos orgánicos son compuestos que contienen hidratos de carbono (CHO) de bajo peso molecular que se encuentran en todos los organismos y que se caracterizan por tener uno o más grupos carboxilo. Dependiendo de las propiedades de disociación y el número de grupos carboxilo, los ácidos orgánicos pueden tener una carga negativa variable, lo que permite la complejación de los cationes metálicos en solución y el desplazamiento de los aniones de la matriz del suelo. Por esta razón, han estado implicados en muchos procesos del suelo, incluida la movilización y absorción de nutrientes por parte de plantas y microorganismos [28].

Uno de los mecanismos responsables de la solubilización de P en las BPS es la producción de ácidos orgánicos. Algunos de los ácidos orgánicos pueden actuar como quelantes desplazando los metales de los complejos de fosfato [25]. El proceso de solubilización de P en suelo es un fenómeno complejo, que se ve gravemente afectado por muchos factores como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno y la humedad [17]. Entre los ácidos orgánicos producidos por las BPS, el ácido glucónico es uno de los más reportados por la literatura [2,29–35]. Se produce principalmente en bacterias, mediado por la enzima glucosa deshidrogenasa en la vía de oxidación directa de la glucosa [27]. Aunque también se han reportado otros ácidos como oxálico, cítrico, succínico, málico, producidos por las BPS que participan en la solubilización de P [17,36–40]. Se cree que el mecanismo principal de la solubilización del fosfato mineral es la liberación de ácidos orgánicos como glucónico que a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo quelan los cationes unidos al fosfato, convirtiéndolo en formas solubles. La capacidad de solubilización de P de los microorganismos se considera uno de los rasgos más importantes asociados con la asimilación de P la planta [37,38,40].

2.1.1.2.1.1. Ácido glucónico

En las bacterias Gram negativas, la solubilización de P mineral se atribuye principalmente a la secreción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, siendo el ácido glucónico el principal descrito (Fig. 2.1), [29,38,41]. La glucosa deshidrogenasa (GDH) se produce en el periplasma de las bacterias Gram negativas y cataliza la oxidación directa de glucosa a ácido glucónico, requiriendo el cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ) para su actividad. La enzima GDH se orienta hacia la cara externa de la membrana citoplasmática y puede oxidar el sustrato en el espacio periplásmico. Como resultado, el ácido glucónico se difunde libremente fuera de la bacteria liberando P soluble, al suministrar protones y aniones que forman complejos con los metales asociados al P [31,33]. Se han identificado genes asociados con la producción de PQQ en diversas bacterias, incluidas *Enterobacter* sp. [42], *Serratia* sp. [41] y *Pseudomonas* sp. [43]. Estos genes están organizados en un operón (pqq) cuyo número y organización de genes varían dentro de diferentes géneros y especies bacterianas [41].

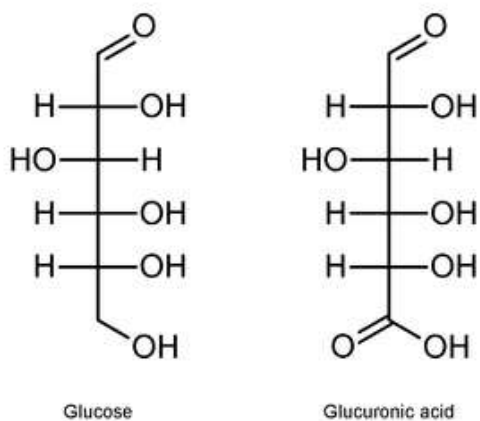


Figura 2.1. Estructura química de la glucosa (izquierda) como sustrato para la producción de ácido glucónico (derecha). Fuente: www.wikipedia.org

2.1.1.2.2. Producción de fosfatasa para la mineralización de P

La mineralización bioquímica de P_o está mediada por enzimas fosfatasa unidas a la pared celular o libres, cuya liberación es impulsada principalmente por la demanda de P. Las enzimas fosfatasas se clasifican en tres: 1) Fosfatasas (fosfohidrolasas), que realizan la desfosforilación de enlaces de fosfoéster o fosfoanhídrido de H₃PO₄ en materia orgánica y se ha demostrado que sus actividades se inhiben al aumentar las concentraciones de ortofosfatos. Son responsables de la mineralización del fósforo orgánico del suelo y de la liberación del fósforo inorgánico

necesario para los microorganismos y las plantas. Existen dos tipos de fosfatasa, las ácidas (E.C. 3.1.3.2) son producidas por microorganismos y plantas superiores, y las alcalinas (E.C. 3.1.3.1), que son producidas principalmente por microorganismos, 2) Fitasas, que causan específicamente la liberación de P del ácido fítico, y 3) Fosfonatasas y C-P liasas, enzimas que realizan la escisión de C-P en organofosfonatos. La actividad principal aparentemente corresponde al trabajo de las fosfatasa y fitasa ácidas debido a la presencia predominante de sus sustratos en el suelo [25,26,44,45]. Se cree que las fosfatasa extracelulares en lugar de las fosfatasa intracelulares o unidas a la membrana, son las responsables de inducir grandes cambios en la concentración de P en la solución del suelo [6]. Entre los compuestos organofosforados que se conocen, los ésteres de fosfato son los más abundantes en la biósfera. El P se encuentra principalmente en su mayor estado de oxidación (+5), como el ortofosfato inorgánico (PO_4^-), y los ésteres de ácido fosfórico. Estas formas químicas de P, generalmente consisten en fosfo mono ésteres de inositol, fosfolípidos y ácidos nucleicos que derivan de plantas y microorganismos [44]. El fundamento de la técnica para la cuantificación de la actividad enzimática fosfatasa se basa en el uso de *p*-nitrofenilfosfato como sustrato, el cual se estima por método colorimétrico. La determinación se lleva a cabo a partir de la hidrólisis del enlace fosfato del sustrato 4-*p*-nitrofenil fosfato en condiciones de alcalinidad mediado por la enzima fosfatasa. Lo que produce la liberación del compuesto 4-*p*-nitrofenol que presenta un color amarillo [45]. La actividad de la enzima fosfatasa se ve afectada por algunos factores como el tipo de sustrato, el pH y la temperatura [46].

2.1.1.3. Factores que afectan la solubilización de P

Algunos de los factores que afectan la solubilización de P en el suelo e identificados como influyentes son: el pH, la salinidad y temperatura, la humedad, la aireación, la intensidad de cultivo, la fertilización con P, entre otros [25,47].

2.1.1.3.1. pH

El pH del suelo influencia en las diferentes formas que se presenta el P. A valores de pH entre 4,0 y 6,0, la mayoría del P_i está presente como ion H_2PO_4^- , a pH entre 6,5 y 7,5, el P_i en la solución del suelo está presente principalmente como H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , mientras que a pH entre 8,0 y 10,0, el ion HPO_4^{2-} es dominante [47]. Los fertilizantes P se aplican con frecuencia en suelos agrícolas intensivos convencionales para suplir la limitación P. Desafortunadamente, la mayoría de los fertilizantes químicos P pueden ser inmovilizados por Ca^{2+} y Mg^{2+} en suelos

alcalinos y por Fe^{3+} y Al^{3+} en suelos ácidos, lo que conduce a la rápida formación de P no disponible para las plantas después de su aplicación [17,48].

2.1.1.3.2. Relación C/N/P

La materia orgánica del suelo es uno de los componentes clave de los suelos, que determina muchos de sus factores físicos, químicos y biológicos. El contenido relativo de C, N y P en la materia orgánica, frecuentemente reportado como las proporciones de C/N, C/P y P/N, puede ser un indicador útil de la calidad del suelo. Cualquier cambio en los ciclos de N y/o P influye fuertemente en la cantidad y transformación de C en los ecosistemas terrestres. En el suelo la relación C/N/P es un factor esencial que puede afectar la solubilización del P. Las proporciones de los elementos pueden variar según el tipo de vegetación y la materia orgánica presente en el suelo. El alto contenido de materia orgánica favorece la mineralización y solubilización del P, debido a que es fuente de C, N, P y S. Estos elementos al ser transformados son liberados en el suelo como formas disponibles para la planta, debido a que la materia orgánica del suelo se encuentra en mayor parte con carga negativa, ocasionando que en el caso de la solubilización por ácidos orgánicos, estos reaccionen con cationes hidroxilados, que da como resultado la inmovilización de estos iones y la consecuente liberación de iones fosfato [49]. Adicionalmente, la relación C/N/P es un factor importante, ya que el balance de estos elementos influencia la solubilización del fósforo. Las proporciones de los elementos pueden variar según las diferentes condiciones como por ejemplo los diferentes tipos de vegetación y materia orgánica presente [49]. En la rizosfera, los mecanismos de solubilización y mineralización ocurren simultáneamente [50]. Wang *et al.*, (2017) reportan que la inmovilización de P es más probable que ocurra cuando la materia orgánica presente en el suelo tienen una relación C/P >300:1, mientras que la mineralización es probable que ocurra cuando esta relación C/P es <200:1 [50].

2.1.1.3.3. Temperatura y humedad

En cuanto a la actividad microbiana, la humedad del suelo es tan importante como la temperatura. La biomasa microbiana del suelo es mayor en suelos con mayor contenido de humedad. Microbiano la variación es significativa durante los cambios rápidos en la humedad del suelo condiciones (por ejemplo, ciclos de secado y rehumectación) [51]. La temperatura es puede llegar a afectar la solubilización del P, pues los microorganismos encargados de la

solubilización en el suelo son principalmente mesófilos y termófilos por lo tanto los ciclos metabólicos pueden verse afectados a temperaturas bajas [52].

2.1.2. Roca fosfórica

Las rocas fosfóricas son rocas compuestas por uno o más minerales fosfáticos y se utilizan como fuente de fosfato de calcio y fósforo y para la producción de fertilizantes artificiales [53]. Colombia tiene un gran potencial como productor de RP siendo de gran importancia las minas presentes en el Departamento de Boyacá de donde se tiene conocimiento de prospectos, manifestaciones y yacimientos de fosforita en los municipios de Sogamoso, Cúitiva, Iza, Nuevo Colón, Pesca, Tota y Turmequé. La RP Pesca (Boyacá), ha sido clasificada como de reactividad intermedia [53], lo cual hace interesante tratar de incrementar su actividad agronómica haciendo más soluble el P presente en ella con la ayuda de BPS [19].

Los depósitos minerales de P son la fuente de fertilizantes fosfatados, que también son limitados y no renovables [10,27,54]. La RP es la materia prima base principal a partir de la cual se pueden fabricar fertilizantes inorgánicos en grandes cantidades [5,55]. La producción química de fertilizantes fosfatados a base de RP es un proceso ineficiente de alto consumo de energía, que genera materiales residuales perjudiciales para el medio ambiente [4]. Otros estudios afirman que a las tasas actuales de extracción, las reservas comerciales mundiales de fosfato se agotarán en 50-100 años [7,54].

Más del 80 % de la producción mundial de roca de fosfato proviene de depósitos sedimentarios, como en el caso de la RP Colombiana, de la cual se estima que las reservas locales rondan las 367 millones de toneladas [3], con un contenido de P_2O_5 que varía entre 20 y 30 % (p/v) [3,20]. Concentración que no es adecuada para la fabricación de fertilizantes fosfatados debido al bajo contenido de P [20] y la baja reactividad del mismo [54]. Si el contenido de P en suelo se tuviera en cuenta en los requerimientos nutricionales del cultivo antes de realizar la siembra, se estima que esto podría reducir la necesidad de fertilizantes inorgánicos en un 50 % [10,56]. También existe la posibilidad de que los bioinoculantes ayuden a reducir los aportes de P al explotar los excedentes de P acumulados en el suelo [10]. Uno de los factores determinantes para la producción de cultivos de calidad es el uso de sustratos adecuados para satisfacer las necesidades nutricionales de las especies [39]. Para que la RP sea efectiva, algunos estudios reportan la

acidulación parcial con ácidos [3,57–61]. El principio se basa en suministrar ácido para la conversión de P insoluble de RP en P soluble. En este contexto, los biofertilizantes como las bacterias solubilizadoras de fosfato (BPS) pueden ser eficaces, pues liberan ácidos orgánicos en la rizósfera, lo que disminuye el pH de esta y ayuda a solubilizar el P insoluble [54,62,63].

2.1.3. Bioinoculantes a base de BPS

En Colombia, según la [Norma Técnica Colombiana NTC 5842 de 2011/2018](#), un bioinoculante es definido como un producto que contiene microorganismos viables benéficos, utilizados en agricultura para la fijación de nitrógeno, solubilización de materiales portadores de nutrientes, promoción del crecimiento vegetal, micorrización o transformación de materia orgánica. El producto no debe contener microorganismos patógenos a humanos, plantas y animales [62,63]. Específicamente un bioinoculante con microorganismos solubilizadores de fosfatos, es el producto elaborado con la finalidad de proporcionar microorganismos capaces de solubilizar formas no disponibles de fósforo y se estipula que deben cumplir los requisitos establecidos en la [Tabla 2.1.](#), durante el periodo de vigencia del producto. [62,63].

Tabla 2.1. Requisitos de los inoculantes elaborados con microorganismos solubilizadores de fosfato según NTC 5842 de 2011/2018

Requisito	Sólido	Líquido
Concentración mínima CFU g ⁻¹ o CFU mL ⁻¹ para productos de uno o varios microorganismos (NTC 5842 del 2011)	1x10 ⁷	1x10 ⁷
Concentración mínima CFU g ⁻¹ o CFU mL ⁻¹ para productos de uno o varios microorganismos (NTC 5842 del 2018)	1x10 ⁴	1x10 ⁴
Pureza microbiológica	95 %	95 %
Actividad biológica: Efectividad, incremento de biomasa o altura o desarrollo radical, en una especie indicadora	90 % Estadísticamente significativo ($\alpha = 0,05$)	90 % Estadísticamente significativo ($\alpha = 0,05$)
Fósforo solubilizado o actividad fosfatasa	Especificado por el productor.	Especificado por el productor.
pH	Especificado por el productor.	Especificado por el productor.
Densidad	Especificado por el productor.	Especificado por el productor.
Humedad	Especificado por el productor.	Especificado por el productor.

La formulación es un aspecto crucial para producir inoculantes. Por lo general, consiste en establecer el ingrediente activo (es decir, microorganismos) en un vehículo adecuado, portador o carrier junto con aditivos que ayudan en la estabilización y protección de las células microbianas durante el almacenamiento y el transporte, y en el sitio objetivo [64,65]. El éxito de un bioinoculante está asociado con el microorganismo y la tecnología utilizada para llevarlo de vuelta a su entorno en un portador [66,67]. Los portadores de inóculo ofrecen la ventaja de proporcionar un hábitat protegido y facilitan el manejo y la mezcla del inoculante en el suelo [68]. Los materiales comunes que se utilizan para liberar bacterias incluyen la turba, la cual está catalogada como uno de los portadores más comúnmente utilizados para inoculantes bacterianos [67,69]. Sin embargo, el uso de turba está limitado por el costo de la extracción y falta de disponibilidad del material en regiones donde no está presente de forma natural [70]. Por lo tanto, los materiales sostenibles y ampliamente disponibles son deseables como portadores alternativos de microorganismos [67,71,72].

Diferentes autores afirmaron que algunos soportes como el BC pueden ayudar a mantener la viabilidad celular y a la actividad biológica durante el período de almacenamiento [66,67,69,73]. Durante las últimas dos décadas, se ha propuesto utilizar microorganismos fosfato solubilizadores como una alternativa económica, pues la inclusión de bioinoculantes a base de estos microorganismos dentro del manejo integrado de nutrientes tiene como objetivo reducir los aportes de fertilizantes inorgánicos al ayudar a explotar las reservas de P presente en el suelo. Sin embargo, es notablemente difícil determinar la efectividad de los bioinoculantes comerciales que se afirma promueven el crecimiento de las plantas [10,74–76], y por lo tanto, surge la necesidad de dilucidar la efectividad y el modo de acción de los bioinoculantes.

2.1.3.1. Bacterias fosfato solubilizadoras (BPS)

Los estudios de absorción de P en plantas han demostrado que las BPS transforman el P_i no disponible en formas de iones fosfato inorgánico monovalente/divalente ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$) los cuales pueden ser asimilados por la planta desde la solución del suelo [27]. Mientras que el P_o debe ser mineralizado, en un proceso de mineralización mediado por enzimas fosfatasas [6,10]. Las BPS utilizan estrategias como la reducción del pH, la quelación de los cationes (principalmente Ca) unidos al P a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo o competir con P por sitios de adsorción, lo que lleva a una mayor solubilidad y disponibilidad de fosfatos

minerales [4,5]. Por otra parte, se ha planteado la hipótesis de que la solubilización sin producción de ácido se debe a la liberación de protones que acompaña a la respiración por la actividad de la ATPasa o la asimilación de amonio [74]. Los protones excretados principalmente por la hidrólisis del ATP mediada por la ATPasa permanecen en la superficie celular, donde el pH disminuye y se activan los mecanismos de transporte. Una pérdida a granel de estos protones en el medio provocaría un gran desperdicio de energía celular. En contraste con esto, la solubilización de metales como Ca^{2+} y Mg^{2+} en suelos alcalinos y Fe^{3+} y Al^{3+} en suelos ácidos parece estar causada por procesos de difusión a gran distancia. Por tanto, debe intervenir un agente disolvente, como los ácidos orgánicos o protones [77]. Varios autores han reportado géneros como *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. y *Enterobacter* spp., como rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas, viven en asociación con las raíces y pueden tener efectos positivos sobre el crecimiento y la salud de las plantas [7,26,40,74,78–80]. Estos géneros de bacterias también han sido reportados como fosfato solubilizadores productores de ácido cítrico, láctico, succínico, glucónico, oxálico, glutámico, pirúvico, entre otros [40,74,79,80]. Aunque de *Kosakonia* spp., hasta el momento son pocos los reportes como bacteria fosfato solubilizadora con actividad fosfatasa ácida y alcalina [35,81,82], se sabe que está estrechamente relacionada con la familia Enterobacteriaceae, mostrando una alta homología con la secuencia del gen 16S rDNA [83,84]. En este estudio, los resultados del análisis taxonómico de *Kosakonia* sp., aislada de suelo en donde se cultiva *A. cepa* L., indicaron que tiene un 99 % de identidad en el 100 % de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a *Kosakonia covanii* [35]. Otros autores han reportado a *Kosakonia* spp. como promotora de crecimiento vegetal [84–86]. En este estudio, las tres BPS estudiadas fueron aisladas de suelo de la rizósfera de cebolla cabezona *A. cepa* L. y son bacilos Gram negativos aerobios, mesófilos.

2.1.3.1.1. *Pseudomonas* spp.

Se ha demostrado que *Pseudomonas* spp., posee capacidad de colonización de plantas, particularmente de la rizosfera, y potentes capacidades de promoción del crecimiento de estas [33]. Se encuentran comúnmente en la rizosfera de cultivos [87]. Es móvil (uno o varios flagelos polares), no esporulada [88]. Tiene el potencial para aumentar la solubilización de P, a través de la producción de ácidos orgánicos [30,34,35]. Blanco-Vargas *et al.*, (2020b) reportaron la producción de ácido glucónico (682 mg L^{-1}), succínico (80 mg L^{-1}), málico (79 mg L^{-1}), cítrico (35 mg L^{-1}) y oxálico (3 mg L^{-1}) por parte de *Pseudomonas* sp., en consorcio con *Serratia* sp. y

Kosakonia sp. a las 6 horas de evaluación, en un medio de cultivo que contenía 5 g L⁻¹ de RP como fuente de P [35]. Yu *et al.*, (2012) reportaron a *Pseudomonas chlororaphis* como productora de ácidos orgánicos (17,18 mmol L⁻¹) a los 7 días de evaluación en medio líquido Pikovskaya suplementado con RP [48].

2.1.3.1.2. *Serratia* spp.

Serratia spp., ha sido reportada como promotora del crecimiento de las plantas mediante la solubilización de P por la producción de ácidos orgánicos, sideroforos y ácido indol acético [89,90]. Abdelhady *et al.*, (2017) reportaron a *Serratia* sp. como solubilizadora de RP con 10,9 mg L⁻¹ de P soluble en medio Pikovskaya suplementado con 5 % de RP a los 8 días de evaluación [91]. *Serratia* spp. también poseen enzimas fosfatasa, las cuales median el proceso de mineralización de P orgánico [25]. Blanco-Vargas *et al.*, (2020) reportaron la actividad volumétrica para fosfatasa ácida (2,3 UP) y fosfatasa alcalina (3,8 UP) por parte de *Serratia* sp., en consorcio con *Pseudomonas* sp., y *Kosakonia* sp. a las 6 horas de evaluación en un medio que contenía hidrolizado de levadura cervecera como fuente orgánica de P y N [35].

2.1.3.1.3. *Kosakonia* spp.

Algunos autores la clasifican como un microorganismo promotor de crecimiento vegetal [85]. Es capaz de fijar biológicamente el N atmosférico, solubilizar el fosfato de calcio y producir fitohormonas como las auxinas y las citoquininas [82]. Algunos autores han trabajado con este género bacteriano, evaluando la solubilización de P en medios como Pikovskaya (PVK) y NBRIP en los que la fuente de P es de más fácil asimilación con respecto a la RP. Panigrahi & Rath., (2019) evaluaron a *K. cowanii* como BPS y reportaron la solubilización de P en medio NBRIP suplementado con AlPO₄ y FePO₄ como fuentes insolubles de P (70,2 mg L⁻¹) con liberación de ácido oxálico, malico, tartrárico y glucónico a los 4 días de cultivo [92]. Cruz Barrera *et al.*, (2019) reportaron que *K. radicincitans* puede solubilizar P en medio líquido PVK cuya fuente de P es el fosfato tricalcico (Ca₃(PO₄)₂) a una concentración de 357,7mg L⁻¹ de P soluble a los 4 días de cultivo, y adicionalmente produce enzimas fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina [82].

Kosakonia sp., está estrechamente relacionada con *Enterobacter* sp., de la que se conocen algunos reportes de solubilización de P de RP que incluyen a este género como BPS [93]. Park *et al.*, (2011) reportaron la producción de ácidos orgánicos (mezcla de ácido láctico, acético, propiónico, pirúvico, malónico, maléico, tartárico, oxálico, succínico, fumárico y cítrico) (1,46

mM) y actividad volumétrica para fosfatasa ácida (46,9 μm de *p*-nitrofenol) y fosfatasa alcalina (85,6 μm de *p*-nitrofenol) a los 14 días de evaluación, en un medio de cultivo NBRIP que contenía 5 g L⁻¹ de RP como fuente de P [93]. Gyaneshwar *et al.*, (1999) evaluaron a *Enterobacter asburiae* en un medio de cultivo sólido reportado por Gyaneshwar *et al.*, (1998) el cual contenía una solución de nutrientes, 1 mg mL⁻¹ de RP previamente esterilizada y rojo de metilo como indicador de pH. Los autores reportaron la producción de ácido dada por el viraje del indicador rojo de metilo. Posteriormente sembraron la BPS en un medio líquido que contenía 1 g mL⁻¹ de suelo alcalino estéril como única fuente de P y cuantificaron ácido glucónico (55 mM), succínico (12,7 mM), acético (0,42 mM) con liberación de P soluble y enzimas fosfatasas [94,95]. Mardad *et al.*, (2013) Reportaron a *Enterobacter* sp. como productora de ácidos orgánicos (61.478 mM) en medio NBRIB con fosfato de calcio (Ca₃(PO₄)₂) como única fuente de P, a los de evaluación 7 días de evaluación [38].

2.1.4. Aprovechamiento de productos del aserrinaje para la producción de BC

La incorporación directa de inóculo líquido a los suelos se complica por la adhesión bacteriana a las partículas del suelo, lo que reduce en gran medida su transporte y la capacidad de colonizar raíces ubicadas en el perfil del suelo [96]. Como soportes para inmovilizar o formular bacterias benéficas se han evaluado diferentes materiales como suelo, compuestos inorgánicos, materiales vegetales como compost o celulosa, materiales inertes como vermiculita, roca fosfórica, poliacrilamida, alginato, desechos orgánicos, estiércol, los cuales garantizan la viabilidad y la actividad biológica del bioinoculante [69]. Particularmente, los residuos lignocelulósicos presentan ventajas entre las cuales se destacan el poseer un alto contenido de materia orgánica e inorgánica que soporta el crecimiento microbiano, se encuentran fácilmente disponibles, son económicos, tienen elevada capacidad de intercambio de cationes, retienen agua y permiten el intercambio de gases [56,69]. Las propiedades del BC varían según la materia prima y los métodos de producción, pero muchos biocharres tienen características que también son propicias para su uso como portadores de inóculo, incluida una alta porosidad interna, una gran superficie específica y la capacidad de adsorber compuestos orgánicos y bacterias [97–99].

La industria maderera produce grandes cantidades de residuos forestales como ramas, partes de árbol, aserrín, corteza, viruta, entre otros derivados, que la mayoría de las veces no son aprovechados eficientemente [69], generando grandes volúmenes de residuos y acumulación de

material que podría ser aprovechado como materia prima para la producción de otros bio productos de mayor valor agregado como por ejemplo la producción de biochar (BC) a través de procesos termoquímicos controlados [56,100]. El BC, conocido como una enmienda del suelo que mejora la fertilidad, también se ha propuesto como soporte alternativo para la formulación de bioinoculantes, con buenos resultados de supervivencia de las bacterias [101].

La producción de residuos orgánicos es alta y crece tanto en áreas rurales como urbanas [97]. Los aserríos de madera, generan gran cantidad de desechos lignocelulósicos que representan alrededor del 50-70 % del producto final [67,69]. Gran parte de los residuos sólidos, incluido el aserrín y la corteza, a menudo se eliminan de manera inapropiada en pilas de desechos de madera [97,102]. El aserrín y la corteza están compuesto por lignocelulosa, uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza [103]. A nivel estructural está conformado por tres biopolímeros, celulosa (35-50 %), hemicelulosa (25-30 %) y lignina (25-30 %), las cuales se encuentran entrelazados por fuerzas no-covalentes, puentes de hidrógeno y enlaces covalentes [69]. Las subunidades de fenil propano están significativamente presentes en la madera pero dependen del material [13]. Mundialmente se producen 1,3 billones de toneladas de residuos lignocelulósicos al año, los cuales presentan potencial para generación de energía y gestión de residuos [98].

Existen numerosas formas de procesamiento de residuos para lograr su valorización. Entre ellos se destaca el proceso de pirólisis para obtener BC; material que tiene un uso importante en sistemas agrícolas [97]. La transformación del aserrín y/o la corteza representa una opción para reutilizar subproductos de madera como portadores de bacterias [67]. Se pueden emplear una serie de procesos termoquímicos termoquímica que incluyen pirólisis lenta, pirólisis rápida, gasificación, carbonización hidrotérmica y carbonización instantánea. Entre estos, la pirólisis lenta produce el mayor rendimiento de BC, mientras que la pirólisis rápida y la gasificación generalmente se utilizan para producir biocombustible [104,105].

El BC se puede producir a partir de biomasa disponible localmente y se esteriliza previamente durante el proceso de pirólisis, lo que facilita la inoculación como último paso en el proceso de producción de un biofertilizante en presentación sólida [98]. La biomasa vegetal es una composición químicamente compleja de carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno, cenizas y pequeñas

cantidades de algunos otros elementos que incluyen metales alcalinos, metales alcalinotérreos y metales pesados. Entre todos estos componentes, la proporción de carbono es más alta, seguida de oxígeno y luego hidrógeno. Dependiendo del tipo de biomasa, también pueden estar presentes elementos como Mg^{2+} , Cl^- y K^+ [106].

2.1.5. Biochar (BC)

Conocido como una enmienda del suelo que mejora la fertilidad [101], también se ha propuesto como un vehículo o soporte alternativo para el soporte de bioinoculantes a base de bacterias, obteniéndose resultados favorables relacionados con viabilidad y actividad biológica [65,68]. Los soportes están destinados a ofrecer un nicho protector para los microorganismos inoculados y, por lo tanto, reducir la competencia con los microorganismos autóctonos [107].

2.1.5.1. Definición

El BC es un carbón rico en carbono altamente condensado obtenido a partir de la conversión termoquímica de la biomasa lignocelulósica bajo condiciones limitadas o libres de oxígeno, útil para aplicación en agricultura sostenible [13,106,108,109]. Diferentes materiales vegetales como residuos de cultivos, malezas y hierbas se han utilizado anteriormente para producir BC [13,110]. Durante la descomposición térmica, la hemicelulosa de celulosa y la lignina que componen el material de partida (en este caso APC) experimentan sus propias vías de reacción, que incluyen la despolimerización y fragmentación, produciendo productos sólidos, líquidos y gaseosos, que se conocen como carbón y bio-aceite, respectivamente, mientras que la mezcla gaseosa que contiene CO , CO_2 , H_2 se llama syngas [111].

2.1.5.2. Factores que afectan la producción de BC

La producción de BC a través de la pirólisis está influenciada por las condiciones de producción como temperatura, humedad, materias primas, ausencia de oxígeno o bajas tensiones y tiempo de residencia, que no sólo controlan el rendimiento del C sino que también afectan la calidad de los productos de la pirólisis. La mayoría de las veces el propósito de la pirólisis es maximizar el rendimiento del producto. La pirólisis básicamente se compone de dos etapas conocidas como pirólisis primaria y pirólisis secundaria. En la pirólisis primaria, la biomasa se descompone y se desvolatiliza en sus componentes principales por el efecto de la temperatura y el tiempo. También se forman diferentes grupos carboxilo y carbonilo. El proceso de volatilización implica

deshidratación, descarboxilación y deshidrogenación de la biomasa. Después de completar la pirólisis primaria, comienza el proceso de pirólisis secundaria, en la que la biomasa se convierte en carbón o gases como CH_2 , CH_4 , CO y CO_2 . Algunas biomoléculas volatilizadas se vuelven a condensar en una fase acuosa llamada bio-aceite [13,98,106].

2.1.5.3. Propiedades físico químicas del BC

El BC no se descompone fácilmente, su estructura podría almacenar, durante miles de años, todo el carbono contenido en él, en lugar de liberarlo a la atmósfera como CO_2 , el principal gas de efecto invernadero. Este hecho puede contribuir a aumentar la productividad agrícola al mejorar la capacidad de retener nutrientes y humedad, además de secuestrar C y reducir el efecto invernadero. Un buen BC proporcionará, aparte de baja densidad y alta capacidad de retención de agua, alta capacidad de intercambio catiónico, buena aireación y drenaje en el suelo, aumentando su capacidad de retención de agua, favoreciendo las condiciones para el desarrollo de las plantas [97,98]. El tamaño pequeño de las partículas de BC ($< 3,0$ mm) da como resultado una mayor área de superficie y baja densidad aparente ($0,4 \text{ g cm}^{-3}$ en comparación con la densidad aparente promedio del suelo de este estudio de $0,9 \text{ g cm}^{-3}$) [13]. Durante la pirólisis, la velocidad de calentamiento y la temperatura de producción tienen un buen efecto sobre la estructura de los poros y el desarrollo del área superficial ya que al incrementar la temperatura la porosidad también se incrementa por la remoción de mayor cantidad de materia volátil y esto conduce al incremento del área superficial en el BC [104,112]. También se encontró que a menor temperatura se detiene la formación de poros como resultado de los alquitranes obtenidos de la descomposición de la madera durante la formación de BC, al igual que también es un determinante del rendimiento y composición del BC obtenido [13,113].

Otra propiedad química del BC son las relaciones atómicas. La concentración de carbono generalmente aumenta mientras que las concentraciones de H, O, N disminuyen a medida que aumenta la temperatura de pirolisis [104,105,114]. Estos cambios también son proporcionados por los espectros infrarrojos transformados de Fourier (FTIR) que indican una mayor aromaticidad y pérdida de grupos funcionales polares cuando la temperatura de producción es alta [16,104,114]. La relación H/C disminuye con el aumento de la temperatura de pirolisis y esta disminución significa que hay una mayor eliminación de hidrógeno. Por otra parte, la estabilidad del BC depende de la relación O/C y también es un indicador de la oxidación del carbono. La

relación O/C además de la temperatura, también depende del material de partida y las condiciones de postproducción. Al aumentar la temperatura de pirólisis, la relación disminuye [13]. La relación H/C es una propiedad material que se correlaciona con el grado de alteración termoquímica que produce estructuras de anillos aromáticos fusionados en el material [115].

El Carbono Orgánico Total (COT) abarca la suma de todos los compuestos orgánicos presentes en el BC y en función de las condiciones externas, una mayor concentración de compuestos orgánicos puede facilitar el crecimiento microbiano [11]. Según el % de COT en el material, el BC se clasifica en tres clases [115].

- Clase 1: ≥ 60 %
- Clase 2: ≥ 30 y < 60 %
- Clase 3: ≥ 10 y < 30 %

2.1.5.3.1. Materias primas

Para abordar un problema específico del suelo, es fundamental conocer las propiedades del BC, resultante al usar determinadas materias primas [116]. Se sabe que las propiedades del biochar se ven afectadas principalmente por las materias primas y la temperatura de pirolisis [117]. En el caso del aserrín y la corteza, durante la pirolisis las cadenas poliméricas de la biomasa (celulosa, hemicelulosa y lignina) se descomponen térmicamente para producir una variedad de productos sólidos, líquidos y gaseosos [97,118]. Los componentes de celulosa y hemicelulosa de la materia prima se degradan térmicamente para producir líquidos orgánicos condensables (ácido acético, acetona y metanol) y gases no condensables, mientras que la estructura de lignina se degrada térmicamente para producir carbón vegetal y fenólicos renovables, lo que favorece la producción y el rendimiento de biochar [108,119].

2.1.5.3.2. Efecto de la temperatura de pirolisis

Durante la pirolisis de la biomasa, ocurre la degradación térmica y carbonización de la hemicelulosa, celulosa y lignina con las subsecuentes transformaciones estructurales [104]. Las altas temperaturas dan como resultado un alto grado de carbonización, lo que resulta en la formación de una estructura aromática y grafitica. Mientras que el rendimiento en biochar, se ve afectado negativamente a altas temperaturas, ya que a mayor temperatura se produzca el BC, disminuye el rendimiento [106,119]. La pirolisis de las materias primas lignocelulosicas se da en

cuatro etapas que incluyen la evaporación de la humedad, la descomposición de la hemicelulosa, la descomposición de la celulosa y descomposición de la lignina [118]. A baja temperatura (<550 °C), el BC tiene una estructura de carbono amorfo con menor aromaticidad que el BC producido a alta temperatura y se favorece la recuperación de C y otros nutrientes como N, P, K, S, ya que estos nutrientes se pierden temperaturas cada vez más altas. Mientras que la pirólisis a alta temperatura (>550 °C) genera un BC con capacidad elevada de absorción. Para una producción optimizada de BC, la temperatura de pirólisis oscila entre 350-800 °C. Al aumentar la temperatura de pirólisis, el rendimiento de BC disminuye y viceversa, variando entre 12 y 35 %, dependiendo del tipo de proceso utilizado: pirólisis lenta o rápida [13,97]. En general, los rendimientos de BC y los grupos funcionales ácidos disminuyen con el aumento de la temperatura de pirólisis, mientras que los de los grupos funcionales básicos, el contenido de cenizas, el pH y la estabilidad del carbono aumentan [111].

Lou *et al.*, (2016) evaluaron el efecto de la temperatura de la pirólisis sobre las propiedades física y químicas de un BC obtenido a partir de aserrín de pino y determinaron que al incrementar la temperatura de pirólisis la porosidad incrementa porque se remueve mayor cantidad de materia volátil y esto conlleva al incremento del área superficial [104]. Por otro lado, a temperaturas que oscilan entre 300 °C y 400 °C, se forman alquitranes que al ser volatizados al alcanzar temperaturas de 500 °C, dejan espacios irregulares similares a los poros [120]. En general, los biochar producidos bajas temperaturas (~300 °C) tienen más grupos funcionales que contienen oxígeno [144].

2.1.5.3.3. Efecto del tiempo de residencia

Respecto a los efectos del tiempo de residencia en la composición del BC en el proceso de pirólisis, el rendimiento de biochar disminuye al aumentar el tiempo de residencia a la misma temperatura de pirólisis. El área superficial específica y el área de los poros disminuye rápidamente cuando el tiempo de residencia excede las 2 horas a altas temperaturas. [106,111].

De acuerdo a la temperatura y tiempo de residencia del BC, el proceso de pirólisis de la biomasa se clasifica en tres tipos:

- Pirólisis lenta o *convencional*: Se ha aplicado convencionalmente para la producción de carbón. Debido al largo tiempo de residencia (que dura de horas a días), la temperatura relativamente baja (>300-700 °C), la velocidad de calentamiento es lenta, el tamaño de partículas oscila

entre 5-50 mm, la descomposición térmica de la biomasa lignocelulósica se da a una velocidad de calentamiento muy baja con tiempo suficiente para reacciones de repolimerización para maximizar los rendimientos sólidos [116].

- Pirólisis rápida o *fast pyrolysis*: Generalmente involucra altas velocidades de calentamiento ($200 - 400 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$) y tiempos de residencia cortos (0,5-10 segundos), el rendimiento de bio-aceite (base de biomasa seca) puede ser tan alto como 50-70 % en peso [116].
- Pirólisis ultra rápida o *flash pyrolysis*: La velocidad de calentamiento es de 10^3 - $10^4 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$ y tiempos de residencia más cortos ($<0,5 \text{ s}$), lo que resulta en rendimientos de bio-aceite muy altos que pueden alcanzar 75-80 % en peso [122,123].

2.1.5.3.4. Oxígeno

La pirólisis oxidativa en la madera de pino se lleva a cabo en tres etapas: secado, emisión de volátiles y oxidación del carbón. Bajo concentraciones de oxígeno, las características de liberación de CO , CO_2 y H_2 se ven afectadas significativamente por la concentración de oxígeno. El tiempo para liberar completamente los componentes del gas se acortan al aumentar la temperatura y la concentración de oxígeno. A alta concentración de oxígeno, la energía de activación para formar CO y CO_2 aumenta mientras que la energía de activación de formación de H_2 disminuye [124,125].

2.1.5.4. Usos y ventajas del biochar en suelo

El BC contiene elementos como carbono condensado, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio. Se ha demostrado que la adición de BC al suelo mejora las propiedades físicas y bioquímicas [110,111], mejora el crecimiento de las plantas y estimula la actividad microbiana del suelo [126,127]. El BC puede influir en la estabilidad estructural del suelo, la porosidad, la conductividad eléctrica, la aireación y la capacidad de intercambio catiónico (CIC), lo que resulta en un aumento de la fertilidad y la productividad del suelo [13,110,128]. El BC ha sido estudiado como soporte para microorganismos benéficos, ya que les proporciona un hábitat y fuente de carbono [126], lo que resulta en un aumento en la tasa de crecimiento de los cultivos de interés [13]. Al igual que otras enmiendas orgánicas, el BC es un recurso rico en macro y microelementos y se ha utilizado para mejorar la deficiencia de micronutrientes, mantener la fertilidad y productividad del suelo, remediar sitios contaminados con metales, secuestra carbono y reducir la emisión de gases de efecto invernadero [13,117,129].

El BC también puede ayudar a mejorar la disponibilidad de P en el suelo, ya que proporciona hábitat y fuente de carbono para las BPS las cuales ayudan a liberar el P en la solución del suelo [130]. El BC ha sido descrito como mejorador de la fertilidad del suelo y secuestrador de C para mitigar el cambio climático. Los efectos observados en la fertilidad del suelo se han explicado principalmente por el aumento del pH en los suelos ácidos y una mejor retención de nutrientes a través de la adsorción de cationes [13,101,131]. El aumento del pH con el aumento de la temperatura de pirólisis se atribuye a la reducción de los grupos funcionales orgánicos, como -COOH y -OH [111]. El pH y la CE del BC dependen del contenido y la composición de la fracción mineral, del tipo de materia prima y de las condiciones usadas durante la pirólisis con que se produjo. Sin embargo, también se ha demostrado que el BC cambia la composición y abundancia de la comunidad biológica del suelo, afectando positivamente los ciclos de nutrientes para mejorar la disponibilidad de los mismos, proporcionando fertilidad del suelo y estabilidad ecológica [13,101,131]. Sin embargo, estos beneficios dependen factores como la temperatura de pirólisis, las condiciones de producción y el tipo de materia prima, que influyen en las propiedades fisicoquímicas del BC y desempeñan un papel crucial en la influencia en los procesos y funciones del suelo, así como a las comunidades microbianas [13,104,117].

2.1.6. Cebolla de bulbo *Allium cepa* L.

La producción agrícola sigue siendo altamente dependiente de la aplicación de fertilizantes de P derivados de la RP. La expansión agrícola continua ha llevado a la saturación de muchos ecosistemas con N y P, lo que resulta en la degradación de los recursos terrestres. Esta preocupación ha expuesto la necesidad de comprender mejor el ciclo del P en la planta, suelo y microorganismos, con el objetivo de reducir la dependencia de los fertilizantes minerales [6]. La horticultura está íntimamente ligada al desarrollo agrícola y rural del país. Las hortalizas de mayor importancia, por el área sembrada y participación en la canasta alimentaria. Los problemas identificados para la cadena hortícola en Boyacá incluyen entre otros los altos costos de producción, desarrollo tecnológico inadecuado e insuficiente, técnicas obsoletas en el manejo de suelos, bajo apoyo en asistencia técnica y disminución en la calidad del suelo. Dentro de los principales productos de la cadena hortícola en el Departamento de Boyacá se encuentra la cebolla de bulbo *Allium cepa* L. con 4.153 ha cultivadas, un rendimiento promedio de 50 tn ha⁻¹, requerimiento de P₂O₅ de 80 Kg ha⁻¹ cosecha⁻¹ [53,132]. Sin embargo, los productores de cebolla a menudo aplican tasas más altas de fertilizantes químicos en un intento por maximizar los

rendimientos de bulbo comercializables [133,134]. La fertilización de la cebolla en Colombia generalmente se realiza sin un diagnóstico integral y se basa casi exclusivamente en la aplicación empírica mediante prueba y error de fertilizantes químicos que contienen los elementos mayores requeridos por la planta (N, P y K) [135]. La cantidad de nutrientes extraídos por el cultivo varían según el cultivar, densidad de plantas, sistema de siembra, tipo de suelo, luz, temperatura y presencia de otros nutrientes que están disponibles y pueden ser absorbidos por la planta determinando los niveles de crecimiento y desarrollo del cultivo [136]. La cebolla (*Allium cepa* L.) pertenece a la familia *Amaryllidaceae*. Se cultiva en todo el mundo y se consume como bulbo maduro crudo o cocinado [129]. La planta se desarrolla a partir de una semilla hasta formar el bulbo. Por cada 100 g de cebolla en peso fresco se obtienen aproximadamente 44 mg de P [137].

El fósforo (P) tiene una movilidad reducida en el perfil de suelo. Lo que implica que la localización del nutriente en el suelo sea importante, ya que este debe encontrarse al alcance de las raíces. Por esta razón, la cebolla es más susceptible a la deficiencia de nutrientes en comparación con otros cultivos. Los contenidos de P del suelo deben ser monitoreados año a año, realizando un análisis de suelo previo a la plantación para conocer el nivel del nutriente residual en el suelo. Las deficiencias de fósforo en el cultivo de *A. cepa* L. retrasan el proceso de maduración y crecimiento del bulbo, raíz y hojas y afectan el rendimiento de la cosecha [132,138].

El cultivo de la cebolla es muy sensible tanto al exceso como al déficit de riego por lo que se recomienda regar frecuentemente (cada 6 a 8 días en surcos, diariamente en goteo) durante toda la etapa de formación de bulbo [132]. La planta de cebolla tiene un sistema superficial de raíces, en donde el 90 % de estas se encuentran ubicadas en los primeros 30 cm de suelo, por lo que tiene un bajo ritmo de crecimiento, su establecimiento en el suelo es lento y es muy susceptible a la competencia con la maleza. La producción del bulbo para consumo fresco se alcanza entre los 150 y 170 días, y si se desea producir semillas se espera la época de la floración posterior al límite antes mencionado [139].

2.1.6.1. Morfología *A. cepa* L.

La cebolla cabezona es una planta bianual. Se desarrolla a partir de una semilla hasta formar un bulbo maduro. Su ciclo biológico involucra dos etapas: 1) Vegetativa, que tiene lugar el primer año de la siembra y da origen a la formación del bulbo, y 2) Reproductiva, que se da en el segundo

año, y sucede cuando a partir del bulbo, la cebolla florece y produce semillas. Morfológicamente esta descrita como una planta herbácea, cuya parte comercial es un bulbo [137,139].

2.1.6.1.1. Semilla

Es pequeña, de color negro, de superficie lisa mientras crece y rugosa al madurar, debido a la pérdida de agua [139]. Mide 2 x 4 mm y está constituida en su mayor parte por el endospermo, al interior del cual se ubica el embrión. Pierde su poder germinativo con rapidez, por lo que se recomienda conservarla a temperatura < 6 °C para conservar su viabilidad [137].

2.1.6.1.2. Hojas

Las hojas o tallo falso, es tubular, erecta, de color verde. Las hojas se desarrollan sucesivamente durante 1 a 10 días después de que se forma la primera, que se van entrelazando unas a otras para formar lo que se conoce como tallo falso [137].

2.1.6.1.3. Tallo

Se encuentra situado en la base del bulbo y de él brotan las yemas, las hojas y las raíces [137].

2.1.6.1.4. Bulbo

Se forma a partir del engrosamiento de las hojas basales (catáfilas) donde se almacenan las sustancias de reservas [139]. Es el órgano en donde se acumulan las sustancias nutritivas de reserva y se forma como resultado de la movilización de carbohidratos en las hojas más jóvenes [137].

2.1.6.1.5. Raíz

El sistema radicular está formado por raíces adventicias originadas en el tallo durante el desarrollo vegetativo. La mayor parte de las raíces están concentradas a una profundidad 25 cm y lateralmente a 15 cm cuando la planta llega a la madurez [139].

2.1.6.2. Nutrientes en cebolla *A. cepa* L.

La cantidad de nutrientes extraídos por la cebolla varían según la densidad de plantas, sistema de siembra; tipo de suelo, luz, temperatura y presencia de otros nutrientes que están disponibles y pueden ser absorbidos por la planta determinando los niveles de crecimiento y desarrollo del

cultivo [136]. Uno de los factores que más limita la producción de cebolla, es la disponibilidad de nutrientes que influyen en la producción y calidad de los bulbos. Los nutrientes se absorben en cantidades reducidas hasta los 85 días. A partir de los 145 días de la siembra, aumenta la intensidad de absorción, destacándose el N y K y en menor escala el P, S, Mg²⁺ y Ca²⁺ [136].

2.1.6.2.1. Nitrógeno

Requerimiento de N: 120 Kg ha⁻¹ cosecha⁻¹ [140].

El nitrógeno es el segundo elemento más acumulado por la planta de cebolla. El exceso de este elemento promueve el crecimiento vegetativo exagerado. Esto se debe al aumento de la síntesis de proteínas y del contenido de agua de la planta, con efecto negativo sobre los procesos de resistencia a enfermedades y calidad de los bulbos [136].

La deficiencia de N está dada por el crecimiento lento, con tallos y hojas color verde pálido. Si el suelo es pobre en este elemento, los síntomas aparecen durante la primera etapa de su desarrollo. Cuando la deficiencia de N es tal, que solo alcanza para mantener la plántula, los síntomas de deficiencia pueden presentarse inclusive después del trasplante de semillero a parcela [132].

2.1.6.2.2. Fósforo

Requerimiento de P₂O₅: 80 Kg ha⁻¹ cosecha⁻¹ [140].

En la producción de hortalizas como *Allium cepa* L. o también llamada cebolla de bulbo la limitación de fósforo en las diferentes etapas de producción (semilleros y parcela) es un factor nutricional que afecta el crecimiento, productividad y rendimiento del cultivo [18,34,35,81]. Básicamente, porque en suelos con pH ácidos el ión ortofosfato se une a otros elementos como hierro y aluminio [141]. Por el contrario, a pHs alcalinos el ión ortofosfato se une a elementos como Calcio y Magnesio, determinando que no esté disponible para las plantas de *A. cepa* L. ya que el rango óptimo de pH para la solubilización de P oscila entre 6,5 y 7,0 [34,35,141].

El fósforo (P) presenta una movilidad reducida en el perfil de suelo. La cebolla presenta un contenido de P en el tejido de 0,25 - 0,35 % (base materia seca). [132]. La cebolla presenta un crecimiento inicial lento hasta próximo a la mitad del ciclo del cultivo; a partir de ese momento comienza la bulbificación y translocación de fotoasimilados al bulbo, con una rápida

acumulación de materia seca. El P a pesar de no ser el nutriente de mayor extracción por el cultivo de la cebolla, es el que ofrece mayor respuesta en la productividad y aumento del peso de bulbos [139]. En la primera etapa el crecimiento es lento y se concentra en la producción de hojas. El inicio de la formación del bulbo esta dado por un rápido alargamiento en la region del cuello o falso tallo, las hojas de reserva se ensanchan lateralmente y las hojas funcionales dejan de formarse conforme progresa el desarrollo del bulbo. Las hojas funcionales dejan de emerger a medida que se va dando la maduración del bulbo. Finalmente, las hojas más antiguas comienzan a deteriorarse de los extremos hacia abajo, indicando la maduración en el bulbo [142].

Hay varios factores que limitan la disponibilidad de fósforo en el suelo, entre los más importantes se encuentran [132]:

- Presencia de carbonatos: Son capaces de precipitar, interactúan fijando el P, por lo cual no estará disponible para la planta.
- Aireación: El oxígeno es crucial para la descomposición microbológica de la materia orgánica del suelo, y esta a su vez es una de las fuentes de P.
- Humedad y compactación: El exceso disminuye la disponibilidad de oxígeno, limitando el desarrollo y crecimiento de las raíces, por lo cual se reduce la absorción de P.
- Temperatura: Cuando es muy baja puede limitar la absorción de P por parte de las plantas.
- pH del suelo: La mayor disponibilidad del fósforo en el suelo se encuentra en un pH 6,0 a 7,0. En suelos ácidos hay fijación por fosfatos de Fe^{3+} , Mg^{2+} y Al^{3+} , y en suelos alcalinos hay fijación por Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ .

La deficiencia de P se refleja en plantas de poco crecimiento en las primeras etapas de desarrollo. Las hojas pueden tomar tono violáceo, quedando pequeñas al igual que las raíces que presentan escaso desarrollo [132].

2.1.6.2.3. Potasio

Requerimiento de K_2O : 150 Kg ha^{-1} cosecha⁻¹ [140].

El potasio es el elemento nutricional importante en la formación del bulbo y conservación en post cosecha [132]. Es un activador de varias enzimas vegetales (sintetas, deshidrogenasas, oxireductasas, quinasas y transferasas) relacionadas con los procesos de asimilación del N que favorece la formación de compuestos nitrogenados [136].

2.2. Referencias

1. Joe MM, Deivaraj S, Benson A, Henry AJ, Narendrakumar G. Soil extract calcium phosphate media for screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Agriculture and Natural Resources*. 2018;52: 305–308. doi:10.1016/j.anres.2018.09.014
2. Ludueña LM, Anzuay MS, Angelini JG, McIntosh M, Becker A, Rupp O, et al. Strain *Serratia* sp. S119: A potential biofertilizer for peanut and maize and a model bacterium to study phosphate solubilization mechanisms. *Applied Soil Ecology*. 2018;126: 107–112. doi:10.1016/j.apsoil.2017.12.024
3. Calle Castañeda SM, Márquez Godoy MA, Hernández Ortiz JP. Solubilization of phosphorus from phosphate rocks with *Acidithiobacillus thiooxidans* following a growing-then-recovery process. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018;34: 1–10. doi:10.1007/s11274-017-2390-7
4. De Oliveira Mendes G, Galvez A, Vassileva M, Vassilev N. Fermentation liquid containing microbially solubilized P significantly improved plant growth and P uptake in both soil and soilless experiments. *Applied Soil Ecology*. 2017;117–118: 208–211. doi:10.1016/j.apsoil.2017.05.008
5. Wei Y, Zhao Y, Fan Y, Lu Q, Li M, Wei Q, et al. Impact of phosphate-solubilizing bacteria inoculation methods on phosphorus transformation and long-term utilization in composting. *Bioresource Technology*. 2017;241: 134–141. doi:10.1016/j.biortech.2017.05.099
6. Jones D, Oburger E. Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. *Phosphorus in Action*. 2011. pp. 169–198. doi:10.1007/978-3-642-15271-9
7. Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*. 2013;2: 587. doi:10.1186/2193-1801-2-587
8. Thakur D, Kaushal R, Shyam V. Phosphate solubilising microorganisms: role in phosphorus nutrition of crop plants-A review. *Agricultural Reviews*. 2014;35: 159–171. doi:10.5958/0976-0741.2014.00903.9
9. Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2009;56: 263–284. doi:10.1556/AMicr.56.2009.3.6
10. Owen D, Williams AP, Griffith GW, Withers PJA. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Applied Soil Ecology*. 2014;86: 41–54. doi:10.1016/j.apsoil.2014.09.012
11. Zheng B-X, Ding K, Yang X-R, Wadaan MAM, Hozzein WN, Peñuelas J, et al. Straw biochar increases the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacterial community for better rape (*Brassica napus*) growth and phosphate uptake. *Science of the Total Environment*. 2019;647: 1113–1120. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.454

12. Zhang J, Feng L, Ouyang Y, Hu R, Xu H, Wang J. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in relation to phosphorus availability under different land uses for some latosols from Guangdong, China. *Catena*. 2020;195. doi:10.1016/j.catena.2020.104686
13. Siddiqui AR, Nazeer S, Piracha MA, Saleem MM, Siddiqi I, Shahzad SM, et al. The production of biochar and its possible effects on soil properties and phosphate solubilizing bacteria. *Journal of Arid Agriculture and Biotechnology*. 2016;1: 27–40. doi:2415-6736
14. Gupta R, Bisaria VS, Sharma S. Response of rhizospheric bacterial communities of *Cajanus cajan* to application of bioinoculants and chemical fertilizers: A comparative study. 2016 [cited 19 Jun 2019]. doi:10.1016/j.ejsobi.2016.02.008
15. Jha A, Saxena J, Sharma V. Investigation on Phosphate Solubilization Potential of Agricultural Soil Bacteria as Affected by Different Phosphorus Sources, Temperature, Salt, and pH. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2013;44: 2443–2458. doi:10.1080/00103624.2013.803557
16. Borno ML, Müller-Stöver DS, Liu F. Contrasting effects of biochar on phosphorus dynamics and bioavailability in different soil types. *Science of the Total Environment*. 2018;627: 963–974. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.01.283
17. Wei Y, Zhao Y, Shi M, Cao Z, Lu Q, Yang T, et al. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*. 2018;247: 190–199. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.092
18. Rafique M, Ortas I, Ahmed IAM, Rizwan M, Afridi MS, Sultan T, et al. Potential impact of biochar types and microbial inoculants on growth of onion plant in differently textured and phosphorus limited soils. *Journal of Environmental Management*. 2019;247: 672–680. doi:10.1016/j.jenvman.2019.06.123
19. Kaur G, Reddy MS. Effects of Phosphate-Solubilizing Bacteria, Rock Phosphate and Chemical Fertilizers on Maize-Wheat Cropping. *Pedosphere: An International Journal*. 2015;25: 428–437. doi:10.1016/S1002-0160(15)30010-2
20. Agencia Nacional de Minería. Roca fosfórica. 2015; 2.
21. Bakhshandeh E, Rahimian H, Pirdashti H, Nematzadeh GA. Evaluation of phosphate-solubilizing bacteria on the growth and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in northern Iran. *Journal of Applied Microbiology*. 2015;119: 1371–1382. doi:10.1111/jam.12938
22. Paul R, Singh RD, Patra AK, Biswas DR, Bhattacharyya R, Arunkumar K. Phosphorus dynamics and solubilizing microorganisms in acid soils under different land uses of Lesser Himalayas of India. *Agroforestry Systems*. 2018;92: 449–461. doi:10.1007/s10457-017-0168-4
23. Pramanik K, Ghosh PK, Ray S, Sarkar A, Mitra S, Maiti TK. An in silico structural, functional and phylogenetic analysis with three dimensional protein modeling of alkaline

- phosphatase enzyme of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15. doi:10.1016/j.jgeb.2017.05.003
24. Malik MA, Marschner P, Khan KS. Addition of organic and inorganic P sources to soil - Effects on P pools and microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*. 2012;49: 106–113. doi:10.1016/j.soilbio.2012.02.013
 25. Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove-A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014;3: 97–110. doi:10.1016/j.bcab.2013.09.008
 26. Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*. 2006;287: 15–21. doi:10.1007/s11104-006-9056-9
 27. Suleman M, Yasmin SI, Rasul M, Yahya M, Manzoor Atta B, Sajjad Mirza M. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *Plos One*. 2018;13. doi:10.1371/journal.pone.0204408
 28. Jones DL. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil* 205: 1998;205: 25–44.
 29. Stella M, Halimi M. Gluconic acid production by bacteria to liberate phosphorus from insoluble phosphate complexes. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*. 2015;43: 41–53.
 30. An R, Moe LA. Regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016;82: 4955–4964. doi:10.1128/AEM.00813-16
 31. Anzuay MS, Ciancio GR, Ludueña LM, Ludueña L, Angelini JG, Barros G, et al. Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. *Microbiological Research*. 2017;199: 98–109. doi:10.1016/j.micres.2017.03.006
 32. Sharon JA, Hathwaik LT, Glenn GM, Imam SH, Lee CC. Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2016;16: 525–536.
 33. Oteino N, Lally RD, Kiwanuka S, Lloyd A, Ryan D, Germaine KJ, et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6: 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.00745
 34. Blanco-Vargas A, Rodriguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Garzon-Jaramillo R, Rivera-Hoyos CM, Díaz-Ariza LA, et al. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*. 2020a;6: e05218. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05218

35. Blanco-Vargas A, Rodriguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, Diaz-Ariza LA, et al. Effect of bioinoculant (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., and *Kosakonia* sp.) on *Allium cepa* L. at plot scale. *Universitas Scientiarum*. 2020b. doi:In review
36. Behera BC, Yadav H, Singh SK, Mishra RR, Sethi BK, Dutta SK, et al. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15: 169–178. doi:10.1016/j.jgeb.2017.01.003
37. Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. 2006;34: 33–41. doi:10.1016/j.apsoil.2005.12.002
38. Mardad I, Serrano A, Soukri A. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research*. 2013;7: 626–635. doi:10.5897/AJMR12.1431
39. Acevedo E, Galindo-Castañeda T, Prada F, Navia M, Romero M. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology*. 2014;80: 26–33. doi:10.1016/j.apsoil.2014.03.011
40. Mardad I, Serrano A, Soukri A. Effect of Carbon, Nitrogen Sources and Abiotic Stress on Phosphate Solubilization by Bacterial Strains Isolated from a Moroccan Rock Phosphate Deposit. *Journal of Advanced J Chemical Engineering*. 2014;4: 1–10. doi:10.4172/2090-4568.1000102
41. Ludueña LM, Anzuay MS, Magallanes-Noguera C, Tonelli ML, Ibañez FJ, Angelini JG, et al. Effects of P limitation and molecules from peanut root exudates on pqqE gene expression and pqq promoter activity in the phosphate-solubilizing strain *Serratia* sp. S119. *Research in Microbiology*. 2017; 1–12. doi:10.1016/j.resmic.2017.07.001
42. Kim CH, Han SH, Kim KY, Cho BH, Kim YH, Koo BS, et al. Cloning and Expression of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Genes from a Phosphate-Solubilizing Bacterium *Enterobacter intermedius*. *Current Microbiology*. 2003;47: 457–461. doi:10.1007/s00284-003-4068-7
43. Choi O, Kim J, Kim JG, Jeong Y, Jae SM, Chang SP, et al. Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiology*. 2008;146: 657–668. doi:10.1104/pp.107.112748
44. Tapia Torres Y, García Oliva F. Phosphorus Availability is a Product of Soil Bacterial Activity in Oligotrophic Ecosystems: a Critical Review. *Terra Latinoamericana*. 2013;31: 231–242.
45. Tabatabai MA, Bremner JM. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 1969;1: 301–307. doi:10.1016/0038-0717(69)90012-1

46. Fitriatin BN, Arief DH, Simarmata T, Santosa DA, Joy B. Phosphatase-producing bacteria isolated from Sanggabuana forest and their capability to hydrolyze organic phosphate. *Journal of Soil Science and Environmental Management*. 2011;2: 299–303.
47. Patiño Torres CO, Sanclemente Reyes OE. Los Microorganismos solubilizadores de Fósforo (MSF): Una Alternativa Biotecnológica Para Una Agricultura Sostenible. *Entramado*. 2014;10: 288–297.
48. Yu X, Liu X, Zhu TH, Liu GH, Mao C. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *European Journal of Soil Biology*. 2012;50: 112–117. doi:10.1016/j.ejsobi.2012.01.004
49. Piaszczyk W, Błońska E, Lasota J, Lukac M. A comparison of C:N:P stoichiometry in soil and deadwood at an advanced decomposition stage. *Catena*. 2019;179: 1–5. doi:10.1016/j.catena.2019.03.025
50. Wang X, Ma X, Yan Y. Effects of soil C:N:P stoichiometry on biomass allocation in the alpine and arid steppe systems. *Ecology and Evolution*. 2017;7: 1354–1362. doi:10.1002/ece3.2710
51. Sun H, Wu Y, Yu D, Zhou J. Altitudinal Gradient of Microbial Biomass Phosphorus and Its Relationship with Microbial Biomass Carbon, Nitrogen, and Rhizosphere Soil Phosphorus on the Eastern Slope of Gongga Mountain, SW China. *PLoS ONE*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0072952
52. Forber KJ, Ockenden MC, Wearing C, Hollaway MJ, Falloon PD, Kahana R, et al. Determining the Effect of Drying Time on Phosphorus Solubilization from Three Agricultural Soils under Climate Change Scenarios. *Journal of Environmental Quality*. 2017;46: 1131–1136. doi:10.2134/jeq2017.04.0144
53. Ruiz CF, Henao Gómez D, Lozano Borda M, Colorado LA, Mora Holguin H, Velandia Sanchez J, et al. Plan estratégico departamental de Ciencia, Tecnología e Innovación - PEDCTI Boyaca. Primera ed. Tunja; 2012.
54. Mahanta D, Rai RK, Dhar S, Varghese E, Raja A, Purakayastha TJ. Modification of root properties with phosphate solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhiza to reduce rock phosphate application in soybean-wheat cropping system. *Ecological Engineering*. 2017;111: 31–43. doi:10.1016/j.ecoleng.2017.11.008
55. De Oliveira Mendes G, Moreira de Freitas LA, Liparini Pereira O, Ribeiro da Silva I, Bojkov Vassilev N, Dutra Costa M. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*. 2014;64: 239–249. doi:10.1007/s13213-013-0656-3
56. Verheijen FGA, Graber ER, Ameloot N, Bastos AC, Sohi S, Knicker H. Biochars in soils: New insights and emerging research needs. *European Journal of Soil Science*. 2014;65: 22–27. doi:10.1111/ejss.12127

57. Zhu J, Li M, Whelan M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of the Total Environment*. 2018;612: 522–537. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.095
58. Jog R, Pandya M, Nareshkumar G, Rajkumar S. Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology*. 2014;160: 778–788. doi:10.1099/mic.0.074146-0
59. Tahir M, Khalid U, Ijaz M, Shah GM, Naeem MA, Shahid M, et al. Environmental Microbiology Combined application of bio-organic phosphate and phosphorus solubilizing bacteria (*Bacillus strain* MWT 14) improve the performance of bread wheat with low fertilizer input under an arid climate. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018;49S: 15–24. doi:10.1016/j.bjm.2017.11.005
60. De Oliveira Mendes G, Bojkov Vassilev N, Araújo Bonduki VH, Ribeiro da Silva I, Ribeiro JI, Dutra Costa M. Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79: 4906–4913. doi:10.1128/AEM.01487-13
61. De Matos CDC, Pacheco Monteiro L, Díaz Gallo SA, Dutra Costa M, Da Silva A alberto. Changes in soil microbial communities modulate interactions between maize and weeds. *Plant Soil*. 2019;440: 249–264. doi:10.1007/s11104-019-04066-1
62. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana NTC 5842 de 2018: Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Bogota, Colombia; 2018.
63. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana NTC 5842 de 2011. Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Bogota, Colombia; 2011.
64. Atieno M, Herrmann L, Okalebo R, Lesueur D. Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012;28: 2541–2550. doi:10.1007/s11274-012-1062-x
65. Araujo J, Díaz-Alcántara CA, Urbano B, González-Andrés F. Inoculation with native *Bradyrhizobium* strains formulated with biochar as carrier improves the performance of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *European Journal of Agronomy*. 2020;113: 125985. doi:10.1016/j.eja.2019.125985
66. Rafique M, Sultan T, Ortas I, Chaudhary HJ. Enhancement of maize plant growth with inoculation of phosphate-solubilizing bacteria and biochar amendment in soil. *Soil Science and Plant Nutrition*. 2017;63: 460–469. doi:10.1080/00380768.2017.1373599
67. Rojas Higuera NS, Pava Sánchez AM, Pinzón Rangel DL, Díaz Ariza LA, Quevedo Hidalgo B, Pedroza Rodríguez AM. Bio-transformed sawdust by white rot fungi used as a carrier for plant growth-promoting bacteria. *European Journal of Wood and Wood Products*. 2017;75: 263–273. doi:10.1007/s00107-016-1099-x

68. Sun D, Hale L, Crowley D. Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier. *Biology and Fertility of Soils*. 2016;52: 515–522. doi:10.1007/s00374-016-1093-9
69. Rojas Higuera NS. Biotransformación y bioenriquecimiento de residuos de aserrio. *Tesis Maestría en Ciencias Biológicas*. Bogotá, Colombia; 2013.
70. Hale L, Luth M, Crowley D. Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. *Soil Biology and Biochemistry*. 2015;81: 228–235. doi:10.1016/j.soilbio.2014.11.023
71. Sarmiento Oviedo MB. Alternativas de compostaje de aserrín de pino caribe (*Pinus caribaea*) en la industria maderera Refocosta S.A., municipio de Villanueva, Casanare, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2011;2: 21. doi:10.22490/21456453.916
72. González-Orozco MM, Prieto-Ruiz JÁ, Aldrete A, Hernández-Díaz JC, Chávez-Simental JA, Rodríguez-Laguna R. Nursery production of *Pinus engelmannii* Carr. with substrates based on fresh sawdust. *Forests*. 2018;9: 1–15. doi:10.3390/f9110678
73. Chen H, Zhang J, Tang L, Su M, Tian D, Zhang L, et al. Enhanced Pb immobilization via the combination of biochar and phosphate solubilizing bacteria. 2019. doi:10.1016/j.envint.2019.03.068
74. Krishnaraj PU, Dahale S. Mineral phosphate solubilization: Concepts and prospects in sustainable agriculture. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 2014;80: 389–405. doi:10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55116
75. Zambrano-Moreno DC, Ramón-Rodríguez LF, Strahlen-Pérez M Van, Bonilla-Buitrago RR. Bioinoculants industry for agricultural use in Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 2015;18: 59–67.
76. Zambrano DC, Bonilla RR, Avellaneda L, Zambrano G. Análisis prospectivo de los bioinsumos agrícolas en Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2015;XVII: 103–113. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.48472
77. Illmer P, Schinner F. Solubilization of Inorganic Calcium Phosphates - Solubilization Mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*. 1995;27: 257–263.
78. Koch S, Majewski E, Schmeisky H, Schmidt FRJ. Critical Evaluation of Phosphate Solubilizing *Pseudomonas* Isolated from a Partially Recultivated Potash Tailings Pile. *Current Microbiology*. 2012;65: 202–206. doi:10.1007/s00284-012-0145-0
79. Valetti L, Iriarte L, Fabra A. Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus*) associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria. *Applied Soil Ecology*. 2018;132: 1–10. doi:10.1016/j.apsoil.2018.08.017
80. Aarab S, Ollero J, Megías M, Laglaoui A, Bakkali M, Arakrak A. Some characteristics of phosphate solubilizing rhizobacteria as an ecological strategy for sustainable agriculture.

81. Moreno-Bayona DA, Gómez-Méndez LD, Blanco-Vargas A, Castillo-Toro A, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales ID RA, et al. Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by *Pleurotus ostreatus* for biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use. *PLoS ONE*. 2019;14: 25. doi:10.1371/journal.pone.0217100
82. Cruz Barrera M, Jakobs-Schoenwandt D, Gómez MI, Becker M, Patel A V, Ruppel S. Salt stress and hydroxyectoine enhance phosphate solubilisation and plant colonisation capacity of *Kosakonia radicincitans*. *Journal of Advanced Research*. 2019. doi:10.1016/j.jare.2019.03.012
83. Kämpfer P, McInroy JA, Doijad S, Chakraborty T, Glaeser SP. *Kosakonia pseudosacchari* sp. nov., an endophyte of Zea mays. *Systematic and Applied Microbiology*. 2016;39: 1–7. doi:10.1016/j.syapm.2015.09.004
84. Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2013;36: 309–319. doi:10.1016/j.syapm.2013.03.005
85. Gao H, Lu C, Wang H, Wang L, Yang Y, Jiang T, et al. Production exopolysaccharide from *Kosakonia cowanii* LT-1 through solid-state fermentation and its application as a plant growth promoter. *International Journal of Biological Macromolecules* 150. 2020;150: 955–964. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.209
86. Berger B, Patz S, Ruppel S, Dietel K, Faetke S, Junge H, et al. Successful Formulation and Application of Plant Growth-Promoting *Kosakonia radicincitans* in Maize Cultivation. *BioMed Research International*. 2018;2018: 1–8. doi:10.1155/2018/6439481
87. Park KH, Lee CY, Son HJ. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. *Letters in Applied Microbiology*. 2009;49: 222–228. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02642.x
88. Paul D, Sankar NS. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science*. 2017;15: 130–136. doi:10.1016/j.aasci.2016.10.001
89. Zaheer A, Mirza BS, Mclean JE, Yasmin S, Shah TM, Malik KA, et al. Association of

- plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. *Research in Microbiology*. 2016;167: 510–520. doi:10.1016/j.resmic.2016.04.001
90. Karlicic V, Radic D, Jovicic-Petrovic J, Lalevic B, Jovanovic L, Kikovic D, et al. Isolation and characterization of bacteria and yeasts from contaminated soil. *Journal of Agricultural Sciences*. 2016;61: 247–256. doi:10.2298/jas1603247k
 91. Abdelhady HM, Abou-Taleb K, Abd el-salam SS, Amin SA, Tayeb ZH. Effect Of Carbon And Nitrogen Sources On Phosphate Solubilization By Some Local Isolates From Egyptian Rock Phosphate Deposit. *Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences Effect*. 2017;8: 452–469. doi:ISSN: 0975-8585
 92. Panigrahi S, Rath CC. Condition Optimization for Phosphate Solubilization by *Kosakonia covanii* MK834804, an Endophytic Bacterium Isolated from *Aegle marmelos*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2019;8: 2823–2835. doi:10.20546/ijcmas.2019.808.325
 93. Park JH, Bolan N, Megharaj M, Naidu R. Concomitant rock phosphate dissolution and lead immobilization by phosphate solubilizing bacteria (*Enterobacter* sp.). *Journal of Environmental Management*. 2011;92: 1115–1120. doi:10.1016/j.jenvman.2010.11.031
 94. Gyaneshwar P, Parekh LJ, Archana G, Poole PS, Collins MD, Hutson RA, et al. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;171: 223–229. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13436.x
 95. Gyaneshwar P, Naresh Kumar G, Parekh LJ. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1998;14: 669–673. doi:10.1023/A:1008852718733
 96. Hale L, Luth M, Kenney R, Crowley D. Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation. *Applied Soil Ecology*. 2014;84: 192–199. doi:10.1016/j.apsoil.2014.08.001
 97. Barros DL, Rezende FA, Campos AT, Maia CMBF. Biochar of Sawdust Origin in Passion Fruit Seedling Production. *Journal of Agricultural Science*. 2017;9: 200. doi:10.5539/jas.v9n5p200
 98. De Bhowmick G, Sarmah AK, Sen R. Production and characterization of a value added biochar mix using seaweed, rice husk and pine sawdust: A parametric study. *Journal of Cleaner Production*. 2018;200: 641–656. doi:10.1016/j.jclepro.2018.08.002
 99. Herrmann L, Lesueur D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97: 8859–8873. doi:10.1007/s00253-013-5228-8
 100. Fox A, Kwapinski W, Griffiths BS, Schmalenberger A. The role of sulfur- and phosphorus-mobilizing bacteria in biochar-induced growth promotion of *Lolium perenne*. *FEMS Microbiology Ecology*. 2014;90: 78–91. doi:10.1111/1574-6941.12374

101. Lehmann J, Rillig MC, Thies J, Masiello CA, Hockaday WC, Crowley D. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biology and Biochemistry*. 2011;43: 1812–1836. doi:10.1016/j.soilbio.2011.04.022
102. Paramashivam D, Clough TJ, Dickinson NM, Horswell J, Lense O, Clucas L, et al. Effect of Pine Waste and Pine Biochar on Nitrogen Mobility in Biosolids. *Journal of Environment Quality*. 2015;45: 360. doi:10.2134/jeq2015.06.0298
103. Morris T, Rojas S, Diaz L, Pedroza A. Evaluation of Cellulolytic and Hemicellulolytic Activity of a Bacterial Consortium Inoculated in Bark of *Pinus caribaea*. Third International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies. Battelle; 2015.
104. Lou K, Rajapaksha AU, Ok YS, Chang SX. Pyrolysis temperature and steam activation effects on sorption of phosphate on pine sawdust biochars in aqueous solutions. *Chemical Speciation and Bioavailability*. 2016;28: 42–50. doi:10.1080/09542299.2016.1165080
105. Lou K. Adsorption of Phosphate and Copper by Pine Sawdust Biochars and Economic Analysis. University of Alberta. 2015.
106. Tripathi M, Sahu JN, Ganesan P. Effect of process parameters on production of biochar from biomass waste through pyrolysis: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016;55: 467–481. doi:10.1016/j.rser.2015.10.122
107. Chen B, Yuan M, Qian L. Enhanced bioremediation of PAH-contaminated soil by immobilized bacteria with plant residue and biochar as carriers. *Journal of Soils and Sediments*. 2012;12: 1350–1359. doi:10.1007/s11368-012-0554-5
108. Yang X, Wang H, Strong PJ, Xu S, Liu S, Lu K, et al. Thermal properties of biochars derived from Waste biomass generated by agricultural and forestry sectors. *Energies*. 2017;10. doi:10.3390/en10040469
109. Kavitha B, Laxma Reddy PV, Kim B, Lee SS, Pandey SK, Kim KH. Benefits and limitations of biochar amendment in agricultural soils: A review. *Journal of Environmental Management*. 2018;227: 146–154. doi:10.1016/j.jenvman.2018.08.082
110. Chen S, Qi G, Ma G, Zhao X. Biochar amendment controlled bacterial wilt through changing soil chemical properties and microbial community. *Microbiological Research*. 2020;231. doi:10.1016/j.micres.2019.126373
111. Cha JS, Park SH, Jung SC, Ryu C, Jeon JK, Shin MC, et al. Production and utilization of biochar: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2016;40: 1–15. doi:10.1016/j.jiec.2016.06.002
112. Quesada-González OC, Cantos-Macias M, Duharte-L W, Pszo-Gonzalez DM, Brigñot-Favier LC. Efecto de la velocidad de calentamiento y la biomasa en la cinética de su pirólisis. *Revista Cubana de Química*. 2019;31. doi:ISSN: 2224-5421
113. Zhu M, Zhou W, Zhang Z, Li J, Zhang D. Effect of Temperature on Pyrolysis Products

- of a Pine Sawdust in an Indirectly Fired Rotary Kiln. 2013; 879–884.
114. Ahmad M, Rajapaksha AU, Lim JE, Zhang M, Bolan N, Mohan D, et al. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*. 2014;99: 19–33. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.10.071
 115. International Biochar Initiative. Standardized product definition and product testing guidelines for biochar that is used in soil. 2012.
 116. Li S, Harris S, Anandhi A, Chen G. Predicting biochar properties and functions based on feedstock and pyrolysis temperature: A review and data syntheses. *Journal of Cleaner Production*. 2019;215: 890–902. doi:10.1016/j.jclepro.2019.01.106
 117. Awad YM, Ok YS, Abrigata J, Beiyuan J, Beckers F, Tsang DCW, et al. Pine sawdust biomass and biochars at different pyrolysis temperatures change soil redox processes. *Science of the Total Environment*. 2018;625: 147–154. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.194
 118. Chang G, Huang Y, Xie J, Yang H, Liu H, Yin X, et al. The lignin pyrolysis composition and pyrolysis products of palm kernel shell, wheat straw, and pine sawdust. *Energy Conversion and Management*. 2016;124: 587–597. doi:10.1016/j.enconman.2016.07.038
 119. Luo L, Xu C, Chen Z, Zhang S. Properties of biomass-derived biochars: Combined effects of operating conditions and biomass types. *Bioresour Technol*. 2015;192: 83–89. doi:10.1016/j.biortech.2015.05.054
 120. Igalavithana AD, Choi SW, Shang J, Hanif A, Dissanayake PD, Tsang DCW, et al. Carbon dioxide capture in biochar produced from pine sawdust and paper mill sludge: Effect of porous structure and surface chemistry. *Science of the Total Environment*. 2020;739: 139845. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139845
 121. Beiyuan J, Awad YM, Beckers F, Tsang DCW, Ok YS, Rinklebe J. Mobility and phytoavailability of As and Pb in a contaminated soil using pine sawdust biochar under systematic change of redox conditions. *Chemosphere*. 2017;178: 110–118. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.03.022
 122. Kan T, Strezov V, Evans TJ. Lignocellulosic biomass pyrolysis: A review of product properties and effects of pyrolysis parameters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016;57: 1126–1140. doi:10.1016/j.rser.2015.12.185
 123. Balat M, Balat M, Kirtay E, Balat H. Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems. *Energy Conversion and Management*. 2009;50: 3147–3157. doi:10.1016/j.enconman.2009.08.014
 124. Liu Z, Zhang F, Yan S, Tian L, Wang H, Liu H, et al. Effects of temperature and low-concentration oxygen on pine wood sawdust briquettes pyrolysis: Gas yields and biochar briquettes physical properties. *Fuel Processing Technology*. 2018;177: 228–236. doi:10.1016/j.fuproc.2018.05.001
 125. Daouk E, Van de Steene L, Paviet F, Martin E, Valette J, Salvador S. Oxidative pyrolysis

- of wood chips and of wood pellets in a downdraft continuous fixed bed reactor. *Fuel*. 2017;196: 408–418. doi:10.1016/j.fuel.2017.02.012
126. Gunjal A, Kapadnis B, Pawar N. Agroindustry by-products as a carrier resource for plant-growth-promoting rhizobacterium, *Bacillus subtilis*. *Journal of Material Cycles and Waste Management*. 2012;14: 274–280. doi:10.1007/s10163-012-0052-2
 127. Khan MS, Zaidi A, Wani PA. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2007;27: 29–43. doi:10.1051/agro:2006011
 128. Rehman RA, Rizwan M, Qayyum MF, Ali S, Zia-ur-Rehman M, Zafar-ul-Hye M, et al. Efficiency of various sewage sludges and their biochars in improving selected soil properties and growth of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Environmental Management*. 2018;223: 607–613. doi:10.1016/j.jenvman.2018.06.081
 129. Khan M, Fatima K, Ahmad R, Younas R, Rizwan M, Azam M, et al. Comparative effect of mesquite biochar, farmyard manure, and chemical fertilizers on soil fertility and growth of onion (*Allium cepa* L.). *Arabian Journal of Geosciences*. 2019;12. doi:10.1007/s12517-019-4734-0
 130. Richardson AE, Simpson RJ. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiology*. 2011;156: 989–996. doi:10.1104/pp.111.175448
 131. Hardy B, Sleutel S, Dufey JE, Cornelis J-T. The Long-Term Effect of Biochar on Soil Microbial Abundance, Activity and Community Structure Is Overwritten by Land Management. *Frontiers in Environmental Science*. 2019;7: 1–14. doi:10.3389/fenvs.2019.00110
 132. Blanco C, Lagos J. Manual de producción de cebolla. Santiago, Chile; 2017. doi:0717-4829
 133. Lee J, Song J, Lee S. Excessive Fertilization is Detrimental to Yield and Quality for Onion Grown on High Organic Matter Content Paddy Soils. *International Journal of Vegetable Science*. 2012;18: 235–244. doi:10.1080/19315260.2011.623147
 134. Batool S, Iqbal A. Phosphate solubilizing rhizobacteria as alternative of chemical fertilizer for growth and yield of *Triticum aestivum* (Var. Galaxy 2013). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019;26: 1400–1410. doi:10.1016/j.sjbs.2018.05.024
 135. Gómez MI, Castro HE, Gómez CJ, Gutiérrez OF. Optimización de la producción y calidad en cebolla cabezona (*Allium cepa*) mediante el balance nutricional con magnesio y micronutrientes (B, Zn y Mn), Valle Alto del Río Chicamocha, Boyacá. *Agronomía Colombiana*. 2007;25: 339–348.
 136. Amaya Robles JE, Méndez García EF. Respuesta de niveles crecientes de NK en la producción de cebolla (*Allium cepa* L.) var. “Roja Arequipeña.” *Scientia Agropecuaria*. 2013;4: 15–25.

137. Moreira Rivas A, Hurtado Roman G. Guia Técnica Cultivo de la Cebolla. San Andres, La Libertad; 2003.
138. Tekeste N, Dechassa N, Woldetsadik K, Dessalegne L, Takele A. Influence of Nitrogen and Phosphorus Application on Bulb Yield and Yield Components of Onion (*Allium Cepa* L.). *Bentham open*. 2018;12: 194–206. doi:10.2174/1874331501812010194
139. Enciso Garay CR, Vera Ojeda PA, Santacruz Toledo AR, Gonzalez Villaba JD. Guia Técnica Cultivo de Cebolla. San Lorenzo, Paraguay; 2019.
140. Guerrero R. Fertilización de cultivos en clima frío. Segunda ed. Barranquilla, Colombia: Sáenz y Cia Ltda; 1998.
141. Kalayu G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*. 2019. doi:10.1155/2019/4917256
142. Pinzón Ramírez H, Ospina JE, Báez A. Curado y Almacenamiento de Cebolla de Bulbo. Asohofrucol. Bogota, Colombia; 2006.

Capítulo 3.

Producción de un bioinoculante a base de bacterias fosfato solubilizadoras

Tabla de contenido

3.1. Introducción	70
3.2. Metodología	73
3.2.1. Muestreo de suelo y aislamiento de BPS.....	73
3.2.2. Índice de solubilización en agar SMRS1-RP.....	74
3.2.3. Prueba de interacción por la técnica de Gauze modificada.....	75
3.2.4. Pruebas preliminares de solubilización.....	75
3.2.5. Elaboración de bancos de células primarios.....	76
3.2.6. Microorganismos e identificación molecular.....	76
3.2.6.1. Prueba de patogenicidad.....	77
3.2.7. Pruebas de solubilización en medio líquido para la selección del consorcio.....	77
3.2.8. Diseño del medio de cultivo MT11B.....	78
3.2.9. Curva de crecimiento en medio de cultivo MT11B.....	79
3.2.10. Caracterización del bioinoculante producido en medio MT11B.....	82
3.2.10.1. Caracterización química y microbiológica del bioinoculante.....	82
3.2.10.2. Estabilidad de la biomasa del bioinoculante a diferentes temperaturas y pH.....	82
3.2.10.3. Actividad fosfatasa ácida y alcalina.....	83
3.2.10.4. Cuantificación de ácidos orgánicos por HPLC.....	84
3.2.10.5. Solubilización de P de RP Calboy® por ácidos orgánicos de síntesis química en las concentraciones y tiempos de producción del consorcio	84
3.2.10.6. Microscopia electrónica de barrido.....	84
3.3. Resultados	86
3.3.1. Muestreo de suelo y aislamiento de BPS.....	86
3.3.2. Índice de solubilización e interacciones.....	87
3.3.3. Pruebas preliminares de solubilización.....	88
3.3.4. Identificación molecular.....	90
3.3.4.1. Prueba de patogenicidad.....	93
3.3.5. Pruebas de solubilización en medio líquido para la selección del consorcio.....	94
3.3.6. Diseño del medio de cultivo para la producción de biomasa.....	95
3.3.7. Curva de crecimiento en medio de cultivo MT11B	99
3.3.7.1. Consorcio (<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Serratia</i> sp. y <i>Kosakonia</i> sp.).....	99
3.3.7.2. Cocultivo (<i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Serratia</i> sp.).....	102
3.3.8. Caracterización del bioinoculante producido con el consorcio en medio MT11B.....	105
3.3.8.1. Caracterización química y microbiológica.....	105

3.3.8.2.	Pruebas de estabilidad de la biomasa del bioinoculante a diferentes temperaturas y pH.....	106
3.3.8.3.	Concentración enzimática y actividad volumétrica.....	108
3.3.8.4.	Producción de ácidos orgánicos del consorcio y solubilización de fósforo de roca fosfórica con ácidos orgánicos producidos comercialmente.....	109
3.3.8.5.	Caracterización morfológica y análisis semicuantitativo de la RP con y sin BPS.....	110
3.4.	Discusión.....	112
3.4.1.	Muestreo de suelo y aislamiento de bacterias fosfato solubilizadoras.....	112
3.4.2.	Índice de solubilización e interacciones.....	115
3.4.3.	Diseño del medio de cultivo y condiciones de producción.....	117
3.4.4.	Curvas de crecimiento y producción de biomasa.....	119
3.4.5.	Estabilidad de la biomasa a diferentes temperaturas y pH.....	124
3.4.6.	Solubilización de P inorgánico.....	126
3.4.7.	Mineralización de P orgánico.....	126
3.5.	Conclusiones.....	130
3.6.	Productos científicos derivados del objetivo específico 1.....	131
3.6.1.	Artículos científicos.....	131
3.6.2.	Formación de talento humano: Trabajos de Grado de pregrado codirigidos, asociados al objetivo específico 1.....	131
3.6.3.	Participación en eventos científicos.....	132
3.7.	Referencias.....	134
3.8.	Anexos.....	147
3.8.1.	Variograma preliminar sitio Pesca.....	147
3.8.2.	Diseño experimental PB para el diseño del medio de cultivo para la producción de biomasa del cocultivo (<i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Serratia</i> sp.).....	148
3.8.3.	Análisis de costos de las materias primas para producción del bioinoculante en medio MT11B.....	149

3.1. Introducción

La aplicación indiscriminada y excesiva de fertilizantes químicos tiene un efecto adverso en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, lo que determina que la producción agrícola y la calidad del suelo disminuya con los años [1–3]. Por estas razones, surge la necesidad de evaluar fuentes alternativas de fertilización mineral y/u orgánico mineral, que soporten las necesidades nutricionales de los cultivos, que favorezcan altos rendimientos y se obtengan alimentos de calidad, de forma tal que no se afecten los procesos biológicos del suelo y no se altere aún más la calidad del recurso hídrico debido a la liberación elevada de nutrientes que causan eutroficación [4].

La roca fosfórica (RP) es una fuente natural de fósforo inorgánico que puede ser alternativa a los fertilizantes obtenidos por síntesis química. El uso eficiente de las reservas naturales de fósforo (P), por ejemplo la RP, son cruciales para garantizar la seguridad alimentaria en el mundo, dado que la mayoría de la RP extraída de los yacimientos naturales se aplica como fertilizantes en cultivos agrícolas [1–3,5]. En este sentido Colombia es un país privilegiado ya que cuenta con yacimientos importantes de RP, localizados en los departamentos de Boyacá, Huila, Norte de Santander, Cauca, entre otros. El contenido de P_2O_5 en estos materiales varía entre 20 y 30 % (p/v), [6]. A pesar de tener alto contenido de P total, este elemento se encuentra en la RP en forma no soluble [7]; por lo tanto, no es una fuente de fósforo directamente disponible para las plantas, lo que implica la necesidad de implementar un pretratamiento químico o microbiológico que favorezca la movilización de los nutrientes insolubles, que promueva la solubilización de P para proporcionar iones ortofosfato ($H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}) en la solución del suelo y se facilite la absorción por parte de las plantas, que dependen de la reposición continua de estos iones, ya que es la forma de P que las plantas pueden asimilar [8,9].

Las bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) constituyen alrededor del 20-40 % de la población microbiana en el suelo. Tienen la capacidad de solubilizar fosfatos minerales como el fosfato tricálcico, el fosfato dicálcico, la hidroxiapatita y la RP a través de mecanismos como 1) La liberación de compuestos complejos o disolventes minerales como aniones ácidos orgánicos, sideróforos, protones, iones hidroxilo y CO_2 . Adicionalmente pueden mineralizar el P_o a través de la producción de enzimas fosfatasas que liberan formas inorgánicas de P en el medio [10–15]. Las BPS se caracterizan por su versatilidad metabólica, capacidad para colonizar raíces,

producción de diversos metabolitos y diversas enzimas [16,17], además, Se han reportado diversos géneros bacterianos con capacidad para solubilizar fósforo como: *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp., *Agrobacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Aerobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp., *Erwinia* spp., y *Serratia* spp. [18–21].

El estudio de los mecanismos de solubilización de P, la selección de bacterias, el diseño o elección de un medio de cultivo y de las condiciones de producción para un bioinoculante a base de BPS, son etapas fundamentales para la obtención de un producto biológico con la capacidad de proporcionar formas de P soluble en la solución del suelo. Para el cultivo de BPS se pueden utilizar fuentes de fósforo orgánicas e inorgánicas como RP, fosfato tricálcico, subproductos agroindustriales ricos en nitrógeno y fósforo orgánico [12,22]. Empleando estas fuentes de fósforo, las BPS producen metabolitos como enzimas, protones, sideróforos, entre otros, que ayudan a la solubilización de P [20]. Por otro lado, a las bacterias se les debe suministrar una fuente de carbono orgánica a partir de la cual puedan obtener la energía y producir ácidos orgánicos que participen activamente en la solubilización de P a pH ácidos [14,23–26]. El P puede estar precipitado o fijado por otros elementos, dependiendo principalmente del pH y del tipo de suelo. En suelos ácidos, los óxidos libres y los hidróxidos de Al^{+3} y Fe^{+3} fijan el P, mientras que en suelos alcalinos el P es fijado por Ca^{+2} y Mg^{+2} [27,28]. La mayoría de los fertilizantes químicos fosfatados se obtienen a partir de RP, cuyas aplicaciones con otras estrategias biotecnológicas mejoran su solubilización y, por tanto, la disponibilidad de fósforo en el suelo [4,29,30].

Se han realizado estudios sobre la fertilidad de suelos donde se ha cultivado cebolla, la interacción de microorganismos y la fuente de fertilizante. La dosis recomendada de fosfato requerido en el cultivo de cebolla es de 80 kg ha^{-1} [31]. El requerimiento de nutrientes se suele cumplir con fertilizantes químicos y rocas fosfóricas (1.250 kg ha^{-1}) [32,33]. Sin embargo, el impacto ambiental de esta práctica y el inminente agotamiento de las reservas globales de rocas fosfóricas, ha presionado la búsqueda de alternativas sostenibles para cumplir con los requisitos de P en la agricultura moderna [34,35]. Por último, a pesar de los beneficios agronómicos que brinda el BPS, sus poblaciones en el suelo no son suficientes para competir con otros microorganismos. Por tanto, los bio-inoculantes compuestos por BPS son una estrategia válida para incrementar

la productividad en los ecosistemas agrícolas [36]. La hipótesis planteada en este capítulo de la investigación, señala que las bacterias que conforman el bioinoculante promueven la solubilización de fósforo, y el objetivo fue desarrollar un bioinoculante a partir de un consorcio de BPS productoras de ácidos orgánicos y fosfatasas, aislado de suelos donde se cultiva cebolla en el Departamento de Boyacá, Colombia.

3.2. Metodología

3.2.1. Muestreo de suelo y aislamiento de BPS

El muestreo de suelo se realizó mediante georreferenciación utilizando un GPS eTREX Vista HCX[®] WGS 84, en dos fincas manejadas de manera convencional en el Valle de Suamóx (Boyacá, Colombia) en las que se cultivada cebolla cabezona (*Allium cepa* L.). La primera finca estaba ubicada en el sitio denominado “Punta Larga” (5°47'03,5”N y 72°58'52,6”W) tenía un área de campo de 230 m². De allí se tomaron 18 muestras de suelo de los primeros 20 cm de terreno cultivable. Mientras que en la segunda finca estaba ubicada en el sitio denominado “Pesca” (5°36'58,5”N y 73°01'42,0”W) tenía 400 m² y se tomaron 19 muestras de suelo (Fig. 3.1). Las 37 muestras se transportaron al laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelo de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, inmediatamente se tomaron las muestras para realizar los análisis microbiológicos (bacterias fosfato solubilizadoras y heterótrofas totales), [22] y posteriormente se secaron durante 24 h a temperatura ambiente para eliminar la humedad. Se tamizaron a un tamaño de partícula de 22 mm para realizar análisis químico (pH), empleando la técnica reportada por Rodríguez & Sánchez., (2018), [37,38]. Posteriormente se generaron mapas predictivos mediante la técnica de Kriging, que al ser un método de inferencia espacial permite estimar los valores de una variable en lugares no muestreados, utilizando la información proporcionada por la muestra para determinar la variabilidad espacial [39].

El recuento se realizó por la técnica de dilución decimal (10^{-1} - 10^{-7}) y siembra en superficie de 0,1 mL de muestra, en agar SMRS1 ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5,0 g L⁻¹, glucosa 10,0 g L⁻¹, extracto de levadura 0,5 g L⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g L⁻¹, KCl 0,2 g L⁻¹, MgSO_4 0,3 g L⁻¹, MnSO_4 0,004 g L⁻¹, FeSO_4 0,0004 g L⁻¹, NaCl 0,2 g L⁻¹, agar 20 g L⁻¹, pH $7,2 \pm 0,2$) [40]. Las cajas se incubaron durante 72 h a 30 °C en una incubadora Memmert[®] y se realizó recuento de bacterias totales (BT) y recuento de bacterias fosfato solubilizadoras (BPS). A continuación, se contaron y se seleccionaron las colonias que presentaron halo de solubilización y acidificación en el medio de cultivo, visualizados por el cambio de color púrpura a color amarillo y zonas claras de solubilización alrededor de las colonias. Posteriormente, se aislaron las colonias por subcultivos en agar SMRS1 modificado con roca fosfórica (RP) como fuente fósforo (Calboy[®]; <http://www.calboy.co>, 2018), (P_2O_5 25 %, CaO 32 %, SiO_2 14 %, Al_2O_3 0,5 % p/v, RP 5 g L⁻¹), (SMRS1-RP) [41]. Las

cajas de Petri se incubaron 72 horas a 30 °C en una incubadora Memmert®. Se realizó coloración de Gram a las colonias aisladas para seleccionar las correspondientes a bacilos Gram negativos, a los cuales se les determinó el índice de solubilización (IS) en cajas de Petri nuevas que contenían agar SMRS1-RP, usando la técnica de microgota que se describe en el siguiente numeral [42].

3.2.2. Índice de solubilización en agar SMRS1-RP

Se prepararon suspensiones de cada una de las bacterias en solución salina al 0,85 % (p/v) a concentración de 10×10^8 células mL^{-1} y se sembraron 9 microgotas de 20 μL en el agar SMRS1-RP pH $7,2 \pm 0,2$ cuya formulación fue: RP (Calboy®; <http://www.calboy.co>, 2018) (P_2O_5 25 %, CaO 32 %, SiO_2 14 %, Al_2O_3 0,5 % p/v) 5,0 g L^{-1} , glucosa 10 g L^{-1} , extracto de levadura 0,5 g L^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g L^{-1} , KCl 0,2 g L^{-1} , MgSO_4 0,3 g L^{-1} , MnSO_4 0,004 g L^{-1} , FeSO_4 0,0004 g L^{-1} , NaCl 0,2 g L^{-1} y agar 20 g L^{-1} . Las cajas se incubaron durante 48 h a 30 °C y se determinó el índice de solubilización (IS) empleando la Ecuación I [43].

$$\text{IS} = \frac{\text{A}}{\text{B}} \quad (\text{Eq. I})$$

Dónde: IS es el Índice de solubilización; A es el diámetro de la colonia en mm + el diámetro del halo de solubilización en mm, B es el diámetro de la colonia en mm. Los resultados corresponden al promedio de nueve réplicas con su respectiva desviación estándar.

Para determinar las diferencias entre los IS de los aislamientos, se realizó análisis de varianza y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey, usando el programa estadístico Minitab® (Minitab 18. Ink. 2018. versión 18.0). Los resultados fueron el promedio de 9 réplicas con su respectiva desviación estándar. Las bacterias que presentaron $\text{IS} > 1,5$ y diferencias significativas ($p < 0,05$), se seleccionaron para continuar con las pruebas de interacción por difusión en agar nutritivo (NA) mediante la técnica de Gauze modificada y reportada por Blanco-Vargas *et al.*, (2020a) y Blanco-Vargas *et al.*, (2020b) [41,44].

3.2.3. Prueba de interacción por la técnica de Gauze modificada

Cada aislamiento seleccionado se reactivó en agar BHI y se prepararon suspensiones (10×10^8 células mL^{-1}) en solución salina al 0,85 % (p/v). Posteriormente, de cada bacteria se sembró 0,1 mL en superficie con espátula Drigalsky. A continuación, se colocaron sobre el agar tres discos de papel de filtro impregnados con 0,1 mL del cultivo bacteriano a enfrentar, a concentración de 10×10^8 Cel mL^{-1} y como control negativo se utilizó un disco de papel de filtro impregnado en agua destilada estéril. Las cajas se incubaron por 48 h a 30 °C en una incubadora Memmert®; el antagonismo se determinó por la presencia o ausencia de halos de inhibición del crecimiento sobre la bacteria sembrada masivamente en la superficie del agar; los resultados se expresaron como milímetros de inhibición (mm) [22,41,44]. Las bacterias que no presentaron antagonismo entre ellas, se emplearon para realizar pruebas preliminares de solubilización en medio líquido SMRS1-RP.

3.2.4. Pruebas preliminares de solubilización

Las pruebas preliminares de solubilización en medio líquido se realizaron en Erlenmeyer de 100 mL con un volumen efectivo de trabajo (VET) de 25 mL de caldo SMRS1-RP, el cual tiene la misma composición del medio SMRS1-RP, pero sin agar. Se inocularon individualmente con 5,0 % (v/v) de un inóculo de cada una de las BPS seleccionadas en la prueba de Gauze modificada, ajustando la concentración al tubo 1 de Mc Farland (3×10^8 UFC mL^{-1}). Las condiciones de cultivo fueron 120 rpm, 30 °C, durante 72 horas en un shaker Innova® 44 de Eppendorf®. Como control absoluto se usó el mismo caldo sin inocular. Los valores obtenidos en el control absoluto fueron restados a los tratamientos para determinar las concentraciones reales de fósforo soluble. Las variables de respuesta evaluadas fueron: pH, recuento de colonias (Log_{10} UFC mL^{-1}) por la técnica de dilución decimal y siembra en superficie en agar SMRS1-RP [22] y la concentración de P soluble (mg L^{-1}) en el sobrenadante obtenido después de centrifugar 20 min a 3578 x g [45]. Se utilizó el test de fosfatos Spectroquant® ref. 114842 (0,5 – 30,0 mg L^{-1}) de Merck (MQuant™ Test Fosfatos) usando como blanco agua destilada, leyendo a una longitud de onda de λ_{357} nm y calculando la concentración en una curva patrón (0,5 – 6,0 mg L^{-1} de ortofosfatos, $y = 0,1477x - 0,0697$, $R^2 = 0,9980$). Como blanco se usó agua destilada. El control absoluto fue el mismo caldo sin inocular (Tabla 3.2). Adicionalmente, se determinó la concentración de glucosa residual (g L^{-1}) por la técnica del ácido 3,5-dinitro salisílico DNS [46] usando como blanco agua destilada y leyendo a una longitud de onda de λ_{540} nm con límites de detección entre 0,2 y 2,0 g

L⁻¹ en un espectrofotómetro marca Thermo Spectronic® modelo Genesys 10. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Las pruebas preliminares de solubilización sirvieron para seleccionar 6 bacterias que presentaron recuentos > 1,0 x 10⁷ UFC mL⁻¹ y P soluble (PS) > 48 mg L⁻¹. La conservación de las bacterias seleccionadas se realizó a -20 °C en glicerol al 25 % (v/v) [47]. Posteriormente se realizó la identificación molecular de las bacterias.

3.2.5. Elaboración de bancos de células primarios

Las tres bacterias seleccionadas, codificadas como A17, A18 y C7 fueron conservadas mediante el método de criopreservación en crioviales de 1,5 mL a -20 °C, utilizando glicerol al 25 % (v/v) como agente crioprotector. La viabilidad del banco se verificó mensualmente, tomando uno de los viales del banco de cada bacteria para realizar diluciones decimales (10⁻¹ - 10⁻¹⁰) y siembra en superficie, en agar BHI (Brain Heart Infusion). Para verificar la pureza de los bancos se realizó tinción de Gram [47].

3.2.6. Microorganismos e identificación molecular

Se utilizaron las bacterias seleccionadas tras cumplir con los criterios de las diferentes pruebas aplicadas. La identificación molecular se realizó secuenciando una región de 1465 pb correspondiente al rDNA 16S, usando los iniciadores 337F, 518F, 907R y 110R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4044206/>). Posteriormente, se realizó la limpieza manual y el ensamblaje de cada una de las secuencias, para obtener las secuencias consenso. El análisis taxonómico se realizó comparando las secuencias consenso contra las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y RDP (Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu>). Las secuencias disponibles en la base de datos RefSeq [48] con las que se obtuvo mayor similitud, se usaron para realizar un alineamiento múltiple con Clustal W [49]. Los árboles filogenéticos se obtuvieron por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor [50] y Bootstrap con 1000 réplicas usando el programa MEGA X [51].

3.2.6.1. Prueba de patogenicidad

Para determinar el carácter no patógeno de las bacterias seleccionadas e identificadas por biología molecular, cada una se sembró (por aislamiento) en agar sangre para verificar la ausencia de β -hemólisis y en agar DNAsa para descartar la presencia de DNAasas [52]. Se seleccionaron únicamente las bacterias no patógenas y las demás se descartaron del estudio pues no resultaron aptas para conformar un bioinoculante [53].

3.2.7. Pruebas de solubilización en medio líquido para la selección del consorcio

Una vez identificadas las tres bacterias que continuaron en el estudio, se realizaron pruebas de solubilización en medio líquido evaluando al consorcio (3 bacterias) y cocultivos (2 bacterias) para seleccionar la mejor combinación de bacterias con la cual se obtuvieran recuentos altos y liberación de P soluble en el medio líquido SMRS1-RP. Se realizaron pruebas de solubilización en medio líquido con las 3 bacterias seleccionadas. Los componentes del medio de cultivo eran grado reactivo; sin embargo, para evaluar la posibilidad de disminuir costos en la producción del bioinoculante, las pruebas de solubilización para el consorcio se realizaron también en medio SMRS1-RP pero formulado con componentes comerciales económicos y de fácil consecución en el mercado. La formulación del medio SMRS1-RP económico fue pH $7,2 \pm 0,2$, $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de RP (Calboy®; <http://www.calboy.co>, 2018) (P_2O_5 25 %, CaO 32 %, SiO_2 14 %, Al_2O_3 0,5 % p/v), glucosa 10 g L^{-1} , $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de hidrolizado de levadura cervecera, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,5 \text{ g L}^{-1}$, KCl $0,2 \text{ g L}^{-1}$, MgSO_4 $0,3 \text{ g L}^{-1}$, MnSO_4 $0,004 \text{ g L}^{-1}$, FeSO_4 $0,0004 \text{ g L}^{-1}$, NaCl $0,2 \text{ g L}^{-1}$. Las condiciones de operación fueron las mismas que cuando se evaluaron las bacterias individualmente en las pruebas preliminares de solubilización: Erlenmeyer de 100 mL con un VET de 25 mL de caldo SMRS1-RP, 120 rpm, 30 °C, durante 72 horas en un shaker Innova® 44 de Eppendorf®. Los tratamientos evaluados consistieron en las diferentes combinaciones posibles con las tres cepas seleccionadas en forma de consorcio (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. y *Kosakonia* sp.) y cocultivo (*Pseudomonas* sp. y *Kosakonia* sp./*Serratia* sp. y *Kosakonia* sp./*Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp.), cultivandolas en medio SMRS1-RP para seleccionar la mejor combinación de bacterias que tuviera el potencial para solubilizar la mayor cantidad posible de P y producir biomasa a las 72 horas de evaluación (Tabla 3.3). La concentración de BPS evaluadas fue del 5 % del volumen efectivo de trabajo (VET) inoculadas de la siguiente forma: 5 % (v/v) de inóculo de consorcio (1,7 % + 1,7 % + 1,7 % v/v) o 5 % (v/v) de inóculo de cocultivo (2,5 % + 2,5 % v/v), ajustando la concentración de cada bacteria al tubo 1 de McFarland (3×10^8 UFC mL^{-1}) antes de ser

combinadas en consorcio o cocultivo. Como control absoluto se usó el mismo caldo sin inocular. Los valores obtenidos en el control absoluto fueron restados a los tratamientos para determinar las concentraciones reales. Las variables de respuesta evaluadas fueron: pH, concentración de P soluble (mg L^{-1}), producción de biomasa (Log_{10} UFC mL^{-1}) y concentración de glucosa residual (g L^{-1}). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado (**Tabla 3.3.**).

Las diferencias entre las variables respuesta de los tratamientos evaluados se determinaron por medio de un análisis de varianza ANOVA y prueba posthoc (Tukey), en función de determinar el tratamiento en el cual se produjera mayor cantidad de biomasa, mayor concentración de P soluble y el consumo de glucosa fuera más eficiente. Se usó un nivel de significancia para todas las pruebas del 5 % ($\alpha=0,05$). Los análisis se realizaron utilizando el software STATISTIX versión 9,0[®] y los resultados son el producto de dos réplicas con su respectiva desviación estándar.

3.2.8. Diseño del medio de cultivo MT11B

Para seleccionar los componentes del medio de cultivo y las condiciones de operación que favorecieran el crecimiento del consorcio (*Kosakonia* sp., *Pseudomonas* sp., y *Serratia* sp.), expresado como (Log_{10} UFC mL^{-1}), se realizó un diseño experimental de tipo Plackett-Burman (PB) con seis factores a dos niveles (+1; -1) y 1 punto central (CP), evaluado por triplicado. En la **Tabla 3.1** se presentan los factores y niveles evaluados. Adicionalmente, se midieron otras variables de respuesta como la concentración de P soluble (mg L^{-1}), el pH y la concentración de glucosa residual (g L^{-1}).

El ensayo se realizó en Erlenmeyer de 100 mL con 25 mL de volumen efectivo de trabajo (VET) de cada uno de los medios a evaluar, de acuerdo con las combinaciones del diseño experimental (**Tabla 3.1**) y se cultivaron a 30 °C en un shaker Innova[®] 44 de Eppendorf[®]. Al completar cada uno de los tiempos evaluados (factor F) se determinó el recuento de colonias de BPS y la concentración de P soluble bajo las mismas condiciones que las pruebas preliminares de solubilización. Los 12 tratamientos y el CP (evaluado por triplicado), tenían una formulación base de sales igual a la del medio SMRS1 (pH: $7,0 \pm 0,2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g L^{-1} , KCl 0,2 g L^{-1} , MgSO_4 0,3 g L^{-1} , MnSO_4 0,004 g L^{-1} , FeSO_4 0,0004 g L^{-1} , NaCl 0,2 g L^{-1}). Se realizó un análisis de

regresión para determinar la influencia de las variables independientes sobre las variables dependientes y un análisis de varianza (ANOVA) y en el programa Desing Expert V 9,0.

Tabla 3.1. Diseño experimental Plackett-Burman para el diseño de medio de cultivo y condiciones de operación a escala de Erlenmeyer.

Factores evaluados						
Tratamiento	A	B	C	D	E	F
	RP (g L ⁻¹)	Glucosa (g L ⁻¹)	Hidrolizado de levadura cervecera (g L ⁻¹)	Agitación (rpm)	Inóculo % (v/v) BPS (4,7x10 ⁸ UFC mL ⁻¹)	Tiempo de cultivo (h)
1	5	5	0,25	200	10	48
2	2,5	5	0,5	120	10	48
3	5	2,5	0,5	200	5	48
4	2,5	5	0,25	200	10	12
5	2,5	2,5	0,5	120	10	48
6	2,5	2,5	0,25	200	5	48
7	5	2,5	0,25	120	10	12
8	5	5	0,25	120	5	48
9	5	5	0,5	120	5	12
10	2,5	5	0,5	200	5	12
11	5	2,5	0,5	200	10	12
12	2,5	2,5	0,25	120	5	12
CP	3,75	3,75	0,375	160	7	30
CP	3,75	3,75	0,375	160	7	30
CP	3,75	3,75	0,375	160	7	30

Una vez seleccionados los componentes del medio de cultivo y las condiciones de operación que favorecieron la producción de biomasa y la solubilización de P, se realizó un análisis de costos directos para producir 1 L de medio MT11B usando los componentes seleccionados en este estudio que adicionalmente son de fácil adquisición en el mercado (económicos), y de los componentes comerciales grado reactivo usados para producir 1 L de medio SMRS1.

3.2.9. Curva de crecimiento en medio de cultivo MT11B

Se realizaron curvas de crecimiento durante 12 horas para determinar el mejor tiempo de producción de biomasa del consorcio y un cocultivo en el medio seleccionado en el diseño Plakett Burman (MT11B) y en caldo SMRS1 como medio control. Las cinéticas de producción se realizaron por triplicado en Erlenmeyer de 100 mL con 25 mL de VET, 10 % (v/v) de inóculo de consorcio (3,3 % v/v de *Pseudomonas* sp. + 3,3 % v/v de *Serratia* sp. + 3,3 % v/v de *Kosakonia*

sp.) o cocultivo (5,0 % v/v de *Pseudomonas* sp. + 5,0 % v/v de *Serratia* sp.) ajustando la concentración de cada bacteria al tubo 1 de McFarland (3×10^8 UFC mL⁻¹) antes de ser combinadas en consorcio o cocultivo, 200 rpm y 30 °C en un shaker Innova[®] 44 de Eppendorf[®]. Los muestreos se realizaron por sacrificio de tres Erlenmeyers cada 2 h y las variables de respuesta fueron el recuento de colonias en agar SMRS1-RP (Log₁₀ UFC mL⁻¹), [22], la glucosa residual (g L⁻¹) por DNS [46], el pH y la concentración de P soluble (mg L⁻¹) centrifugando los cultivos durante 20 min a 3578 \times g y recuperando posteriormente el sobrenadante para determinar la concentración de P soluble, empleando el Kit Test fosfatos Spectroquant[®] de Merck (MQuant[™] Test Fosfatos). Las absorbancias se leyeron a λ_{357} nm y la concentración se determinó utilizando una curva patrón (0,5 – 6,0 mg L⁻¹ de ortofosfatos $y=0,1657x - 0,0080$, $R^2=0,9970$) [45]. Como control absoluto se usó el mismo caldo sin inocular. Los valores obtenidos en el control absoluto fueron restados a los tratamientos para determinar las concentraciones reales. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

A partir de los resultados de las curvas de crecimiento se calcularon los siguientes parámetros de producción del consorcio: velocidad volumétrica de crecimiento (K_0 , UFC mL⁻¹ h⁻¹), tiempo de duplicación (dt, h) [54], rendimiento de biomasa/sustrato $Y_{(x/s)}$, (Ecuación II), [54], rendimiento de fósforo/glucosa $Y_{(p/s)}$, (Ecuación III), [54], rendimiento de ácido (glucónico, succínico, málico, cítrico u oxálico)/glucosa $Y_{(Ac/s)}$, (Ecuación IV), [54], productividad volumétrica para la biomasa (Ecuación V), [54], productividad del producto final, sea actividad fosfatasa ácida, actividad fosfatasa alcalina, concentración de P en solución y concentración de ácidos orgánicos (Ecuación VI) [54]. Con los resultados de productividad y rendimiento se realizó una comparación de medias entre medios de cultivo (MT11B y SMRS1) para determinar diferencias significativas entre ellos ($\alpha= 0,05$). Con los resultados de cada medio se realizó un análisis múltiple de correlación de variables (Pearson). Todas las pruebas se realizaron con el programa estadístico SAS[®] para Windows (SAS Institute 2017. versión STAT 9,0. Cary, NC: SAS Institute) con intervalo de confianza del 95 %.

$$Y_{(x/s)} = \frac{UFC_f - UFC_i}{S_0 - S_f} \quad (\text{Ec. II})$$

Dónde: $Y_{(X/S)}$ es el rendimiento de la biomasa - sustrato (glucosa) ($\text{UFC mL}^{-1} \text{g}^{-1} \text{L}^{-1}$), UFC_f son las unidades formadoras de colonia finales (UFC mL^{-1}), UFC_i : unidades formadoras de colonia iniciales (UFC mL^{-1}), S_0 : sustrato inicial (g L^{-1}), S_f es el sustrato final (g L^{-1}).

$$Y_{(P/S)} = \frac{P_f - P_i}{S_0 - S_f} \quad (\text{Ec. III})$$

Dónde: $Y_{(P/S)}$ es el rendimiento del producto (P soluble) - sustrato (glucosa) (mg g^{-1}), P_f es el producto final (mg L^{-1}), P_i : producto inicial (mg L^{-1}), S_0 : sustrato inicial (g L^{-1}), S_f es el sustrato final (g L^{-1}).

$$Y_{(Ac/S)} = \frac{Ac_f - Ac_i}{S_0 - S_f} \quad (\text{Ec. IV})$$

Dónde: $Y_{(Ac/S)}$ es el rendimiento del producto (ácido orgánico sea glucónico, succínico, málico, cítrico u oxálico) dividido por el sustrato (glucosa) (mg g^{-1}), P_f es el producto final (mg L^{-1}), P_i : producto inicial (mg L^{-1}), S_0 : sustrato inicial (g L^{-1}), S_f es el sustrato final (g L^{-1}).

$$\text{Productividad biomasa} = \frac{X_f - X_0}{t} \quad (\text{Ec. V})$$

Dónde: X_f es la biomasa final (UFC mL^{-1}), X_0 es la biomasa inicial (UFC mL^{-1}), t es el tiempo (h) donde se alcanza la máxima biomasa.

$$\text{Productividad producto} = \frac{P_f - P_0}{t} \quad (\text{Ec. VI})$$

Dónde: P_f es el producto final (mg L^{-1}), P_0 es el producto inicial (mg L^{-1}), t es el tiempo (h) en donde se observó mayor cantidad de producto expresado como actividad fosfatasa ácida (UP h^{-1}), actividad fosfatasa alcalina (UP h^{-1}), P soluble ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$) o ácido orgánico ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

3.2.10. Caracterización del bioinoculante producido en medio MT11B

Se produjeron lotes nuevos en medio MT11B que se emplearon para realizar las pruebas químicas y microbiológicas, determinar de la estabilidad de la biomasa a diferentes temperaturas y pH, cuantificar de la actividad volumétrica de fosfatasa ácida y alcalina, la producción de ácidos orgánicos, solubilización de P de RP Calboy® con ácidos orgánicos producidos por el consorcio. Se realizaron observaciones de la RP al inicio y al final de la cinética, para describir la morfología, la superficie y observar la formación de películas bacterianas sobre la RP por medio de microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopía por dispersión de energía (EDS) para análisis elemental semicuantitativo (MEB/EDS).

3.2.10.1. Caracterización química y microbiológica del bioinoculante

Al bioinoculante producido por 6 horas en medio MT11B, se le determinó la concentración de fósforo total en mg L^{-1} (PT) [55], fósforo soluble en mg L^{-1} [45] y pH. En relación con la caracterización microbiológica se realizó recuento de BPS totales y recuento de BPS por morfotipo [22].

3.2.10.2. Estabilidad de la biomasa del bioinoculante a diferentes temperaturas y pH

Para la prueba de estabilidad a diferentes temperaturas se produjo un nuevo lote del bioinoculante y se subdividió en alícuotas de 20 mL. Las submuestras se transfirieron a tubos de 50 mL estériles y se almacenaron a 8, 20, 30, 40 y 50 ± 2 °C por 12 h [56]. Como control absoluto se usó el medio de cultivo sin bacterias. Los valores obtenidos en el control absoluto fueron restados a los tratamientos para determinar las concentraciones reales de P soluble. Transcurrido el tiempo de evaluación se tomaron muestras para realizar diluciones seriadas y siembra en agar SMRS1-RP para determinar el recuento de colonias (UFC mL^{-1}), la concentración de P soluble (mg L^{-1}) y el pH final. Los resultados de UFC mL^{-1} se transformaron y expresaron en porcentaje de estabilidad de la biomasa asumiendo como 100 % la concentración inicial. Como control abiótico se usó medio MT11B sin inocular, se mantuvo por 12 horas bajo las mismas condiciones y se midieron las mismas variables de respuesta. La concentración de P soluble corresponde a la resta del P soluble del tratamiento y de su control.

Para el ensayo de estabilidad a diferentes pH, el bioinoculante se subdividió en alícuotas de 10 mL y se transfirieron por triplicado a tubos de 15 mL estériles. Se ajustó cada submuestra para

obtener valores de pH inicial de 3, 4, 5, 6 y $7 \pm 0,2$, empleando HCl (0,1 M) y NaOH (0,1 M). Cada triplicado se almacenó por 12 h a 19 °C (temperatura ambiente) [56]. Transcurridas las 12 horas se evaluaron las mismas variables de respuesta mencionadas en la prueba de estabilidad de la biomasa a diferentes temperaturas bajo las mismas condiciones. Como control absoluto se usó el medio de cultivo sin bacterias. Los valores obtenidos en el control absoluto fueron restados a los tratamientos para determinar las concentraciones reales.

Para las pruebas de estabilidad a diferentes pH y temperaturas, se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey. El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico Minitab® (Minitab 18. Ink. 2018. versión 18,0).

3.2.10.3. Actividad fosfatasa ácida y alcalina

El protocolo descrito por Tabatabai & Bremner (1969), [57], con una modificación de Rodríguez *et al.*, (2009), [58] y reportado por Blanco-Vargas *et al.*, (2020b), [44], fue usado para determinar la actividad fosfatasa. Se trabajaron dos baterías de tubos, uno para fosfatasas ácidas (pH $6,5 \pm 0,2$) y otro para fosfatasas alcalinas (pH $11,0 \pm 0,2$). El bioinoculante se centrifugó a $3578 \times g$ por 20 minutos a 19 °C. Se recuperó el sobrenadante y se filtró consecutivamente a través de cartuchos Vivaflow 200 Hydrosart de 100.000 y 10.000 Da, para concentrar las fosfatasas presentes. A continuación, se transfirieron 200 μL a un tubo Eppendorf limpio y estéril, se añadieron 150 μL del sustrato *p*-nitrofenil fosfato (0,1 M) preparado en una solución buffer universal MUB a pH $6,5 \pm 0,2$ y MUB a pH $11,0 \pm 0,2$ según correspondiera, y se incubó a 37 °C por 1 hora. Una vez cumplido el tiempo de reacción se añadieron 100 μL de CaCl_2 (0,5 M) y 400 μL de NaOH (0,5 M) para detener la reacción enzimática y se centrifugó a $3578 \times g$ por 10 min a 19 °C. Posteriormente, se leyó la absorbancia a $\lambda_{400 \text{ nm}}$ en espectrofotómetro Genesis-20. Las absorbancias de los triplicados se transformaron a concentración empleando una curva patrón de *p*-nitrofenol para fosfatasas ácidas ($0,000 - 0,144 \mu\text{mol mL}^{-1}$, ecuación: $y=8,6992x$, $R^2=0,9998$), y una curva patrón de *p*-nitrofenol para fosfatasas alcalinas ($0,000 - 0,144 \mu\text{mol mL}^{-1}$, ecuación: $y=8,7726x$, $R^2=0,9998$). Para esta técnica una unidad fosfatasa (1 UP) es igual a una $\mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$ de *p*-nitrofenol liberado, bajo las condiciones de reacción [44,57,58].

3.2.10.4. Cuantificación de ácidos orgánicos por HPLC

Los ácidos orgánicos estándar (Ac. glucónico, ac. succínico, ac. málico, ac. cítrico y ac. oxálico) producidos por Sigma-Aldrich se prepararon en la fase móvil (H_2SO_4 0,01N) a concentración final de 100 mg L^{-1} . Para identificar y cuantificar los ácidos orgánicos producidos por las BPS en el medio de cultivo MT11B, se tomaron $20 \mu\text{L}$ del sobrenadante del cultivo previamente centrifugado durante 20 min a $3578 \times g$ y filtrado por membrana de polietersulfona (PES) de $0,25 \mu\text{m}$ y se inyectaron al cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC. Se utilizó una columna SH1011 con H_2SO_4 0,01N (fase móvil). El caudal se mantuvo a $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Los ácidos orgánicos detectados se identificaron al comparar sus tiempos de retención y las áreas de los picos de sus cromatogramas con los de los estándares de cada uno de los ácidos, mediante un detector de UV a 210 nm [8,25,59,60].

3.2.10.5. Solubilización de P de RP Calboy® por ácidos orgánicos de síntesis química en las concentraciones y tiempos de producción del consorcio

De acuerdo con el tipo y la concentración de ácidos orgánicos cuantificados en el bioinoculante a las 6 horas de cultivo, se prepararon las soluciones de ácido glucónico, oxálico, cítrico, málico y succínico, siguiendo la metodología descrita por Leal (2016) y De Oliveira *et al.*, (2020) con una modificación y reportado por Blanco-Vargas *et al.*, (2020b) [5,44,61]. Los ensayos de solubilización de RP se realizaron en frascos pequeños cilíndricos de vidrio de 10 mL que contenían 3 mL de cada ácido a la concentración producida por el consorcio y 3 g L^{-1} de RP (Calboy®; <http://www.calboy.co>, 2018) (P_2O_5 25 %, CaO 32 %, SiO_2 14 %, Al_2O_3 0,5 % p/v). Los frascos se agitaron a 180 rpm y $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60, 120 y 180 minutos en un Shaker incubadora innova 4300. Finalizado el tiempo, se determinó la concentración de P soluble (mg L^{-1}) [45]. Cada determinación se realizó por triplicado.

3.2.10.6. Microscopia electrónica de barrido

La morfología y las características superficiales de la RP antes del cultivo y de la RP con BPS, después de 6 horas de cultivo en medio MT11B, se observaron por microscopia electrónica de barrido (MEB) y los elementos químicos predominantes fueron determinados por microanálisis elemental a través de espectroscopía por dispersión de energía (EDS), con un microscopio de barrido de electrones JEOL, modelo JSM 6490-LV con potencia entre 10 - 20 kV y magnificaciones entre 1.000 - 10.000 X. La primera muestra correspondió a la RP comercial,

antes de ser adicionada al medio MT11B, como uno de sus componentes. La segunda muestra corresponde al bioinoculante tras seis horas de producción, centrifugación durante 20 min a $3578 \times g$ y el sedimento se recuperó para secado lento a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Previo al análisis, las muestras fueron recubiertas con oro, en condiciones de vacío con un Metalizador Desk IV en un sólo ciclo de revestimiento.

3.3. Resultados

3.3.1. Muestreo de suelo y aislamiento de BPS

A partir de 37 muestras de suelo, se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} y se realizaron siembras en cajas de Petri con agar SMRS1. Los recuentos de BPS variaron entre 4×10^8 y 1×10^5 UFC g^{-1} sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los puntos de muestreo de suelo en ambas fincas. Los coeficientes de variación en los dos lugares de muestreo fueron, para el sitio de Punta Larga $CV = 13,79$ y $CV = 16,45$ para el sitio de Pesca. El pH del suelo fue el parámetro con menor variabilidad ($CV=3,6$), los valores oscilaron entre 5,1 y 8,3 para ambos sitios de muestreo.

Los resultados de autocorrelación mediante las mediciones de Moran's I indicaron que hay significancia únicamente para las variables de BPS ($p=0,0428$) y pH ($p=0,0492$) en Punta Larga. Para el lugar de Pesca, ninguna de las variables presentó autocorrelación ($p > 0,05$) por lo que no fue posible realizar los variogramas de distribución espacial. Sin embargo, en el [Anexo 3.8.1 \(Fig. 3.10\)](#), se presenta un variograma preliminar de las variables recuento de bacterias y pH del suelo. La [Fig. 3.1](#) muestra la variabilidad espacial de las BPS y el pH en Punta Larga usando el método de interpolación de Kriging, donde la distancia de dependencia espacial efectiva fue hasta los 14 m de cada punto de muestreo.

Se obtuvieron 185 colonias de bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) las cuales se fueron purificando por subcultivos en agar SMRS1. Tras los subcultivos se descartaron 133 aislamientos porque no crecieron o porque no solubiliaron y se seleccionaron 52 aislamientos que a partir de ese momento se tomaron como el 100 % de colonias de BPS, para iniciar las pruebas de selección. Los 52 aislamientos (100 % inicial) presentaron halo de solubilización a su alrededor y se observó acidificación del medio por el cambio de color púrpura a color amarillo.

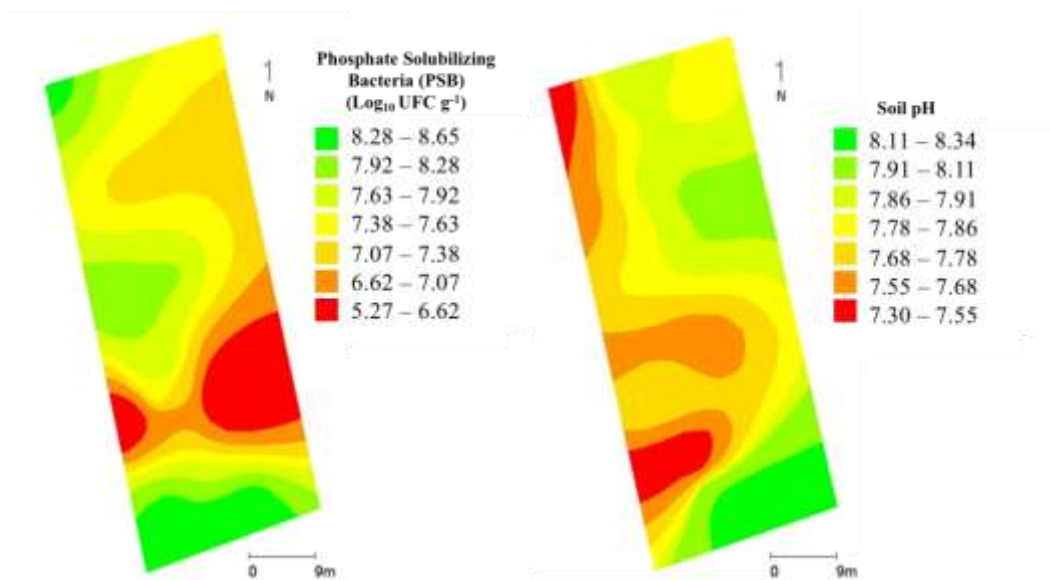


Figura 3.1. Distribución espacial de las propiedades del suelo en el sitio Punta Larga. Izquierda, bacterias fosfato solubilizadoras y derecha, pH del suelo.

3.3.2. Índice de solubilización e interacciones

A partir de los 52 aislamientos de BPS (100 % inicial), se realizó coloración de Gram para seleccionar 51 bacilos Gram negativos (98 % del 100 % inicial). Se determinó el índice de solubilización (IS) en medio SMRS1-RP con el fin de estimar cuantitativamente la capacidad de las bacterias para solubilizar P a partir de RP, como fuente de P inorgánico en medio sólido, en donde solo 28 bacterias (54 % del 100 % inicial) de las 51 bacterias presentaron IS > 1,5 y diferencias significativas en el análisis de varianza ($p < 0,05$) a las 48 horas de incubación. Los resultados se muestran en la [Tabla 3.2](#).

En las pruebas de interacción, 18 bacterias (35 % del 100 % inicial) de las 28 evaluadas no presentaron halos de inhibición a las 48 h de incubación. No se observó antagonismo entre las 18 bacterias bajo las condiciones experimentales evaluadas, por lo tanto, se asumió una interacción positiva o neutralista que permitió mezclarlas entre ellas sin afectar el crecimiento y fueron seleccionadas para realizar las pruebas preliminares de solubilización de P de RP en medio líquido SMRS1-RP. Las 10 bacterias restantes (19 % del 100 % inicial) de las 28 evaluadas en las pruebas de interacción, codificadas como A4, A7, A14, A19, A21, A22, C1, C2, C3-1, C3-2 fueron descartadas del estudio pues presentaron antagonismo entre ellas, observado a través de la presencia de halos de inhibición alrededor de la colonia.

3.3.3. Pruebas preliminares de solubilización

Las 18 bacterias que no presentaron halo de inhibición en las pruebas de interacción fueron A8, A9, A11, A12, A13, A15, A16, A17, A18, C7, C8, C9-1, C9-2, C15, C18, C22, C23-1 y C23-2 (Tabla 3.2). La concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo era $10,0 \pm 2,0 \text{ g L}^{-1}$, la cual fue consumida casi en su totalidad por 16 de las 18 bacterias evaluadas, a las 72 horas de cultivo. Las bacterias A8 y A17 se diferenciaron de las demás por el bajo consumo de glucosa ($2,6 \pm 0,6$ y $4,6 \pm 0,8 \text{ g L}^{-1}$). Especialmente la bacteria A17 presentó uno de las concentraciones más altas de P soluble en el medio ($48,2 \pm 9,5 \text{ mg L}^{-1}$) demostrando el uso eficiente de la fuente de carbono al consumir poca glucosa para liberar una de las más altas concentraciones de P soluble. La mayor concentración de P soluble se presentó en el medio con las bacterias A9, A11, A17, A18, C7 y C8 con valores entre $> 48,2 \pm 9,5$ y $89,5 \pm 4,7 \text{ mg L}^{-1}$ y recuentos entre $8,3 \pm 0,9$ y $11,1 \pm 0,8 \text{ Log}_{10}$ de UFC mL^{-1} a las 72 horas de cultivo; estas dos variables se usaron como criterio para tomar la decisión de continuar únicamente con estas 6 bacterias.

En relación al pH final del medio se observó la acidificación en todos los casos, corroborando el uso de la fuente de carbono para producir ácidos orgánicos y liberar P soluble en el medio.

Tabla 3.2. Resultados de las pruebas preliminares individuales a las 72 horas de evaluación en medio líquido SMRS1-RP de las 18 bacterias que no presentaron halos de inhibición en las pruebas de interacción (IS = 0).

Código de la bacteria	Índice de solubilización	Fósforo soluble (mg L^{-1})	pH final del medio	Log_{10} de UFC mL^{-1}	Glucosa consumida (g L^{-1})
A8	$2,3 \pm 0,2^b$	$26,3 \pm 0,8^b$	$4,6 \pm 0,3^b$	$10,9 \pm 0,5^a$	$2,6 \pm 0,6^c$
A9	$2,1 \pm 0,3^b$	$87 \pm 18,0^a$	$3,7 \pm 0,0^c$	$9,4 \pm 0,8^c$	$9,8 \pm 0,1^a$
A11	$2,3 \pm 0,3^b$	$80,1 \pm 34,9^a$	$3,8 \pm 0,0^c$	$8,6 \pm 0,9^c$	$9,5 \pm 0,6^a$
A12	$1,5 \pm 0,0^c$	$8,1 \pm 3,4^c$	$3,8 \pm 0,0^c$	$9,2 \pm 0,6^c$	$9,6 \pm 1,3^a$
A13	$2,0 \pm 0,1^b$	$5,4 \pm 2,9^c$	$3,6 \pm 0,0^d$	$7,6 \pm 0,2^c$	$9,9 \pm 0,5^a$
A15	$1,8 \pm 0,2^c$	$35,0 \pm 11,3^b$	$3,9 \pm 0,1^c$	$8,6 \pm 0,0^c$	$10,0 \pm 0,0^a$
A16	$2,2 \pm 0,2^b$	$8,4 \pm 0,4^c$	$4,3 \pm 0,0^b$	$9,3 \pm 0,1^c$	$9,0 \pm 0,2^a$
A17	$2,1 \pm 0,2^b$	$48,2 \pm 9,5^a$	$3,2 \pm 0,0^e$	$10,9 \pm 0,5^a$	$4,6 \pm 0,8^b$
A18	$2,1 \pm 0,2^b$	$66,2 \pm 13,4^a$	$3,5 \pm 0,0^d$	$9,0 \pm 0,5^c$	$9,8 \pm 1,8^a$
C7	$2,0 \pm 0,8^b$	$89,5 \pm 4,7^a$	$3,7 \pm 0,0^c$	$8,3 \pm 0,9^d$	$8,4 \pm 0,6^a$
C8	$2,0 \pm 0,2^b$	$82,1 \pm 10,1^a$	$3,8 \pm 0,0^c$	$11,1 \pm 0,8^a$	$9,5 \pm 0,6^a$
C9-1	$2,2 \pm 0,3^b$	$29,1 \pm 6,1^b$	$4,3 \pm 0,0^b$	$10,8 \pm 0,6^a$	$9,8 \pm 1,5^a$
C9-2	$2,6 \pm 0,4^b$	$39,6 \pm 3,4^b$	$4,3 \pm 0,0^b$	$9,5 \pm 0,1^c$	$9,3 \pm 0,8^a$
C15	$1,7 \pm 0,2^c$	$1,8 \pm 1,1^c$	$4,8 \pm 0,0^b$	$10,4 \pm 0,1^b$	$8,6 \pm 0,5^a$

C18	2,0 ± 0,2 ^b	45,3 ± 30,3 ^b	3,9 ± 0,0 ^c	10,2 ± 0,1 ^b	10,0 ± 0,0 ^a
C22	2,0 ± 0,2 ^b	14,8 ± 16,1 ^b	4,4 ± 0,3 ^b	9,4 ± 0,0 ^c	10,0 ± 0,0 ^a
C23-1	2,2 ± 0,2 ^b	6,5 ± 4,2 ^c	5,7 ± 0,9 ^a	8,7 ± 0,1 ^c	10,0 ± 0,0 ^a
C23-2	1,9 ± 0,1 ^c	28,1 ± 21,4 ^b	3,9 ± 0,2 ^c	9,5 ± 0,0 ^c	9,9 ± 0,1 ^a

Los códigos de las 6 bacterias resaltadas en negrilla presentaron las concentraciones más altas de P soluble en medio SMRS1-PR a las 72 horas de evaluación

Se seleccionaron 6 bacterias (12 % del 100 % inicial) (A9, A11, A17, A18, C7 y C8) que en las pruebas preliminares presentaron las concentraciones más altas de P soluble ($> 48,2 \pm 9,5 \text{ mg L}^{-1}$) en medio SMRS1-RP a las 72 horas de evaluación (**Tabla 3.2**). Se realizó una comparación de medias de la liberación de P soluble (mg L^{-1}), pH, producción de biomasa ($\text{Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$), y la glucosa consumida (g L^{-1}) para determinar diferencias entre las bacterias. Como medio control se usó caldo SMRS1 bajo las mismas condiciones de cultivo del medio SMRS1-RP. Los resultados de la comparación de las variables evaluadas en los dos medios de cultivo se muestran en la **Fig. 3.2**. En medio SMRS1 la liberación de P soluble fue mayor para todas las bacterias con respecto al medio SMRS1-RP. Las concentraciones fueron $111,9 \pm 10,1 \text{ mg L}^{-1}$ (A9), $111,5 \pm 7,7 \text{ mg L}^{-1}$ (A11), $91,6 \pm 49,1 \text{ mg L}^{-1}$ (A17), $134,3 \pm 9,8 \text{ mg L}^{-1}$ (A18), $112,6 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$ (C7) y $104,6 \pm 7,9 \text{ mg L}^{-1}$ (C8) en medio SMRS1 y 87 ± 18 , $80,1 \pm 34,9$, $66,2 \pm 13,4$, $89,5 \pm 4,7$; $82,1 \pm 10,1$ para A9, A11, A18, C7 y C8 en medio SMRS1-RP. La bacteria A17 presentó la menor concentración de P soluble en medio SMRS1-RP ($48,2 \text{ mg L}^{-1}$). En medio SMRS1 el P soluble liberado fue mayor que en medio SMRS1-RP debido a que el primero tiene en su formulación fosfato tricálcico como fuente de P y este es de más fácil degradación que la RP que contiene el medio SMRS1-RP (**Fig. 3.2a**). El pH final de todas las bacterias fue ácido, con valores $< 3,8$ en medio SMRS1-RP indicando la producción de ácidos en el medio (**Fig. 3.2b**). La producción de biomasa fue superior en medio SMRS1-RP para 5 de las 6 bacterias evaluadas: $9,4 \pm 0,8$, $8,6 \pm 0,9$, $9,0 \pm 0,5$, $8,3 \pm 0,9$, $11,1 \pm 0,8 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ (A9, A11, A18, C7 y C8), con respecto a la biomasa producida en medio en SMRS1: $8,8 \pm 0,1$, $7,4 \pm 0,1$, 14 . La bacteria A17 fue la excepción en cuanto a producción de biomasa, ya que se obtuvo un mayor crecimiento en medio control SMRS1 ($14,0 \pm 0,1 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$) con respecto al medio evaluado SMRS1-RP ($10,9 \pm 0,5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$).

En todos los casos se observó la utilización de la glucosa como fuente de carbono para la producción de ácidos orgánicos, acidificación del medio y liberación de P soluble (**Fig. 3.2**). Por

esta razón se procedió a realizar la identificación molecular que se presenta en el [siguiente numeral](#), para determinar de estas 6 bacterias cuales y cuantas podrían continuar en el estudio.

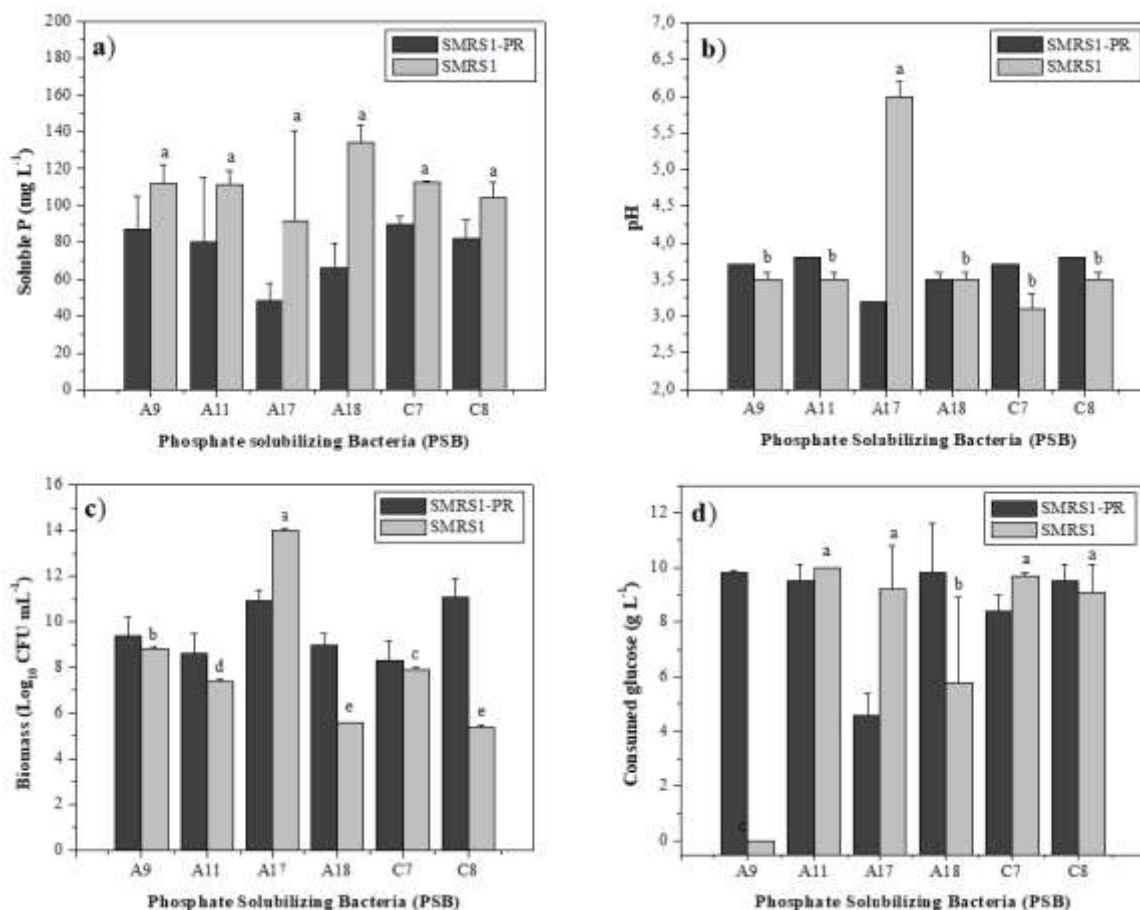


Figura 3.2. Pruebas preliminares de solubilización en medio SMRS1 con las 6 bacterias seleccionadas en las pruebas preliminares en medio SMRS1-RP a las 72 horas de evaluación. **a)** Liberación de P soluble (mg L⁻¹), **b)** pH, **c)** Producción de biomasa (Log₁₀ UFC mL⁻¹), y **d)** Glucosa consumida (g L⁻¹).

3.3.4. Identificación molecular

Para el aislamiento A17, el clasificador de RDP (Ribosomal Database Project) determinó que se trata de un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* con 100 % de confianza. La base de datos de secuencias 16S RDP, usando el algoritmo Seqmatch-RDP contra aislamientos cultivados indicó que la secuencia problema ensamblada es muy similar en la mayoría de su longitud con las cepas tipo, identificadas como *Kosakonia cowanii*. Los resultados del análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada de 1078 pb contra la base de datos refseq del NCBI, indican que tiene 99 % de identidad en el 100 % de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16s pertenecientes a *Escherichia hermannii* o *Kosakonia cowanii*. El árbol de

distancias (**Fig. 3.3a**) construido a partir de las 30 secuencias tipo de microorganismos cultivables más cercanas, disponibles en la base de datos de Refseq/NCBI, muestra que la secuencia problema se agrupó con secuencias de las especies *Escherichia hermannii* y *Kosakonia cowanii*. De acuerdo con el análisis anterior y teniendo en cuenta que la metodología utilizada sólo permite en este caso la identificación confiable hasta nivel de especie, el aislamiento A17 se clasificó como *Kosakonia cowanii*.

Según los resultados obtenidos en la base de datos RefSeq/ARN 16S ribosomal del NCBI, el aislamiento A18 (secuencia consenso de 927 pb) fue clasificada en el género *Pseudomonas*, con 99 % de identidad en el 100 % de su longitud con *Pseudomonas koreensis* y *Pseudomonas moraviensis*. Sin embargo, en el análisis filogenético se observó una mayor cercanía con *Pseudomonas koreensis*, indicando mayor probabilidad de pertenecer a esta especie (**Fig. 3.3b**).

En relación con el aislamiento C7, los resultados del análisis taxonómico de la secuencia ensamblada de 842 pb, comparados con las secuencias reportadas en RefSeq/ARN 16S ribosomal del NCBI, ubicaron a la cepa en el género *Serratia* con 99 % de identidad en el 100 % de su longitud con secuencias pertenecientes a *Serratia liquefaciens*, *Serratia quinivorans* y *Serratia grimesii*, datos consistentes con lo obtenido en el análisis filogenético, donde no se observó agrupación con alguna especie en particular (**Fig. 3.3c**). Teniendo en cuenta que C7 demostró tener un alto índice de solubilización de fosfato, podría tratarse de *Serratia liquefaciens* ya que se ha reportado que esta especie tiene gran capacidad para solubilizar fosfato inorgánico [28].

Al realizar la identificación molecular, los resultados obtenidos en el análisis taxonómico de las secuencias ensambladas de 1114 pb, 1082 pb y 1114pb correspondientes a los aislamientos con código A9, A11 y C8 respectivamente, contra la base de datos refseq/RNA del NCBI, indicaron que tienen 99 % de identidad con el 100 % de cobertura, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes al género bacteriano *Enterobacter* sp, el análisis contra las bases de datos RDP y Greengenes sólo permitió la identificación hasta el género, en este caso *Enterobacter* sp.; sin embargo por medio de la comparación de la secuencia con la base de datos de NCBI se logró determinar que A9 y C8 corresponden a *Enterobacter cloacae* y A11 a *Enterobacter ludwigii*, estos tres géneros bacterianos a pesar de haber demostrado capacidad para solubilizar RP y no ejercer efecto antagónico, son patógenos de origen intestinal [62,63] razón por la cual no son aptos para hacer parte de un bioinoculante y por esta razón se descartaron del estudio.

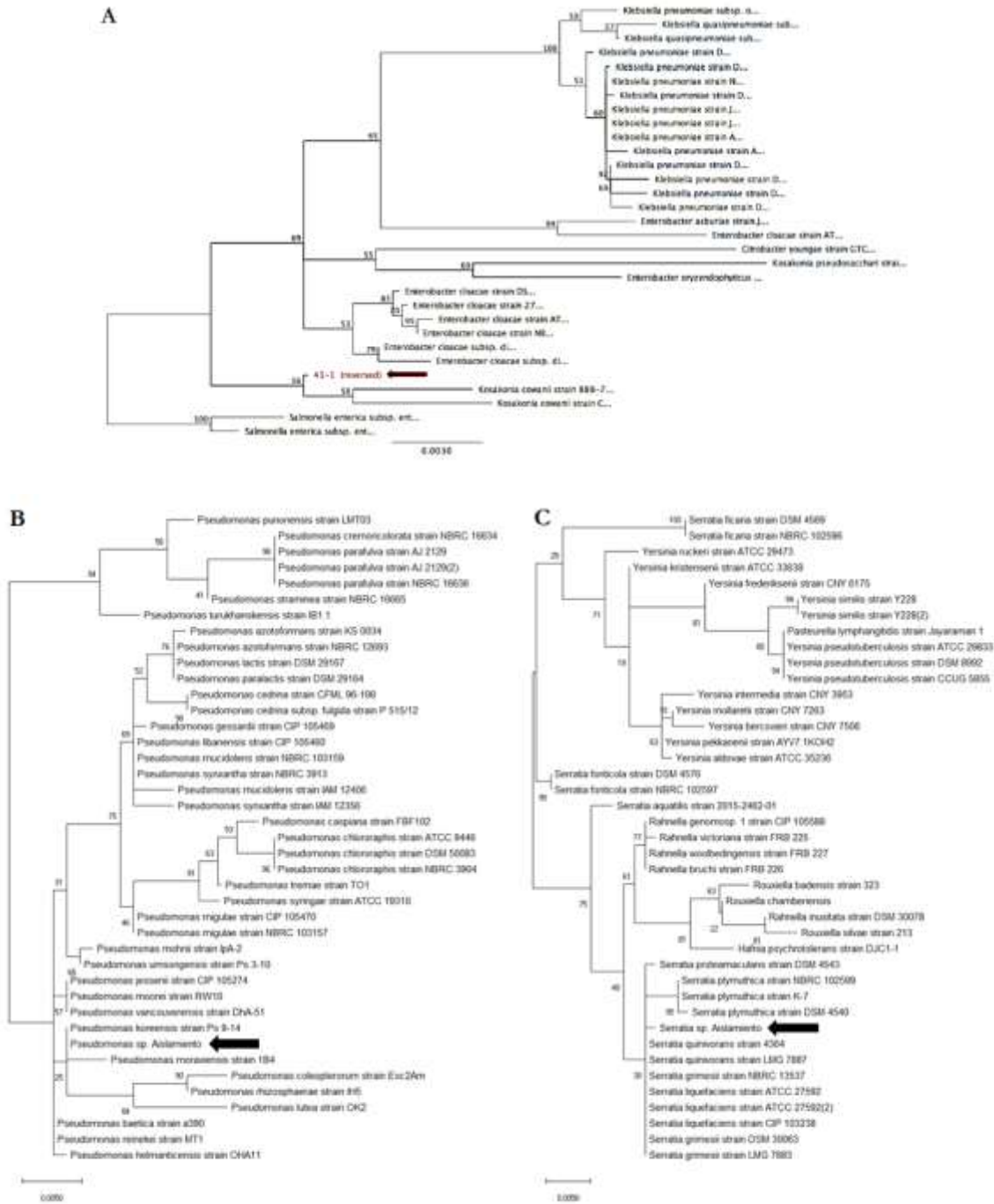


Figura 3.3. Análisis filogenético del gen 16S ribosomal de *Kosakonia* sp. (A17), *Pseudomonas* sp. (A18), y *Serratia* sp. (C7). **A)** Árbol de distancias construido a partir de los 30 mejores “hits” con respecto a la base de datos de Refseq/NCBI para identificación de *Kosakonia* sp. **B)** y **C)** Historia evolutiva utilizando el método de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*) basado en el modelo de Jukes-Cantor y *Bootstrap* con 1000 réplicas para *Pseudomonas* sp., B), y *Serratia* sp., C). El porcentaje de árboles en los que se agruparon los taxones asociados se muestran junto a las ramas. Los árboles se presentan a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró para cada caso, 41 secuencias de nucleótidos. Los aislamientos A17, A18 y C7 se encuentran señalados con una flecha.

3.3.4.1. Prueba de patogenicidad

Las tres bacterias se sembraron en agar sangre y agar DNasa ($2,0 \text{ g L}^{-1}$ de ácido desoxirribonucleico), para verificar la presencia o ausencia de α - y β -hemólisis y observar la presencia o ausencia de las enzimas desoxirribonucleasas. Después de 24 h 30°C , se observó el crecimiento de las colonias y ninguna de ellas produjo actividad de β -hemólisis o DNAasa (no se observaron halos claros alrededor de las colonias), (Fig. 3.4), [44].

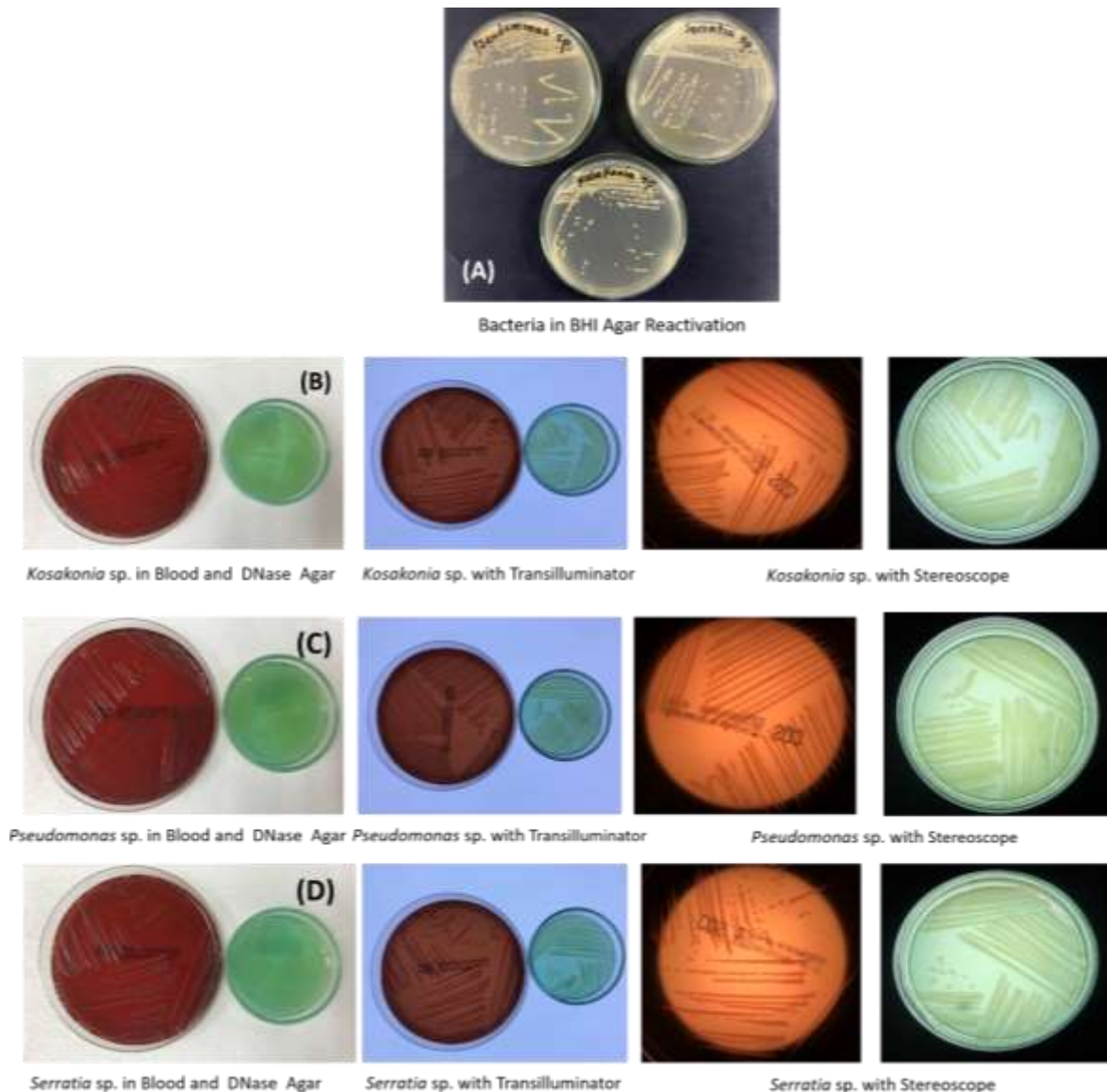


Fig. 3.4. Prueba de verificación de β -hemólisis y actividad deoxirribonucleasa. **(A)** Reactivación y siembra (por aislamiento) de *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp., en agar BHI, por 24 h a 37°C . **(B)** *Kosakonia* sp., que no muestra actividad β -hemolítica en agar sangre o actividad desoxirribonucleasa en agar ADNasa **(C)** *Pseudomonas* sp., que no muestra actividad β -hemolítica en agar sangre o actividad desoxirribonucleasa en agar ADNasa. **(D)** *Serratia* sp., que no muestra actividad β -hemolítica en agar sangre o actividad desoxirribonucleasa en agar ADNasa. Las fotografías de la primera columna de la izquierda se tomaron con luz blanca. Las fotografías de la segunda columna

se tomaron con luz de fondo blanca utilizando un transiluminador. Las fotografías de las dos últimas columnas de la derecha se observaron en un estereoscopio para generar una mayor definición de colonias y observar la ausencia o presencia de pequeños halos de hemólisis e hidrólisis. Todas las cajas se incubaron durante 24 ha 37 °C.

3.3.5. Pruebas de solubilización en medio líquido para la selección del consorcio

En base a la identificación molecular se seleccionaron 3 bacterias (6 % del 100 % inicial) no patógenas y las otras 3 se descartaron del estudio porque las especies resultaron patógenas por lo cual no fueron aptas para hacer parte de un bioinoculante [41,44].

Los resultados se muestran en la **Tabla 3.3**, en donde para el consorcio (T1) se obtuvo una concentración de biomasa superior en el medio SMRS1-RP económico ($7,5 \pm 0,3 \text{ Log}_{10}$ de UFC mL^{-1}) con respecto al medio SMRS1-RP ($2,3 \pm 0,5 \text{ Log}_{10}$ de UFC mL^{-1}). Los resultados de la variable biomasa se tuvieron en cuenta para tomar la decisión de desarrollar las siguientes pruebas de la investigación usando la formulación del medio SMRS1-RP económico (0,02 USD L^{-1}) (**Anexo 3.8.3 (Tabla 3.12A)**). La liberación de P soluble y consumo de glucosa a las 72 horas en los dos medios, las concentraciones para consorcio fueron similares.

Uno de los tratamientos en los que se obtuvieron respuestas similares a las del consorcio (T1) fue el cocultivo T4 conformado por *Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp. Estadísticamente no hubo diferencias significativas entre estos dos tratamientos para las variables evaluadas ($p < 0,05$) y por esta razón algunas pruebas para el cocultivo T4 se siguieron desarrollando en paralelo con el consorcio.

Un aspecto importante a destacar fue el bajo consumo de glucosa en T1 y T4 a las 72 horas de evaluación ($0,9 \pm 0,7$ y $0,8 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ respectivamente). Teniendo en cuenta que el medio estaba formulado con 10 g L^{-1} de glucosa y los resultados mostraron un bajo consumo de la misma $< 1 \text{ g L}^{-1}$, se decidió reducir la concentración de este componente en 0,5 veces (5 g L^{-1}) para un nivel alto y en 0,25 veces ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) para el nivel bajo, en la prueba siguiente correspondiente al diseño del medio de cultivo.

Los tratamientos T2 y T3 se descartaron del estudio ya que mostraron un elevado consumo de glucosa ($8,3 \pm 1,7$ y $5,9 \pm 0,0 \text{ g L}^{-1}$) y la liberación de P soluble fue inferior a las concentraciones obtenidas en los tratamientos seleccionados ($35,4 \pm 14,6$ y $81,3 \pm 4,5 \text{ mg L}^{-1}$ para T1 y T3) (**Tabla 3.3**).

Tabla 3.3. Tratamientos evaluados en consorcio y cocultivos, con las cepas seleccionadas e identificadas como *Kosakonia* sp., *Pseudomonas* sp., y *Serratia* sp.

Tratamiento	Consortio/ Cocultivo	Biomasa inicial (Log ₁₀ de UFC mL ⁻¹)	Biomasa final (Log ₁₀ de UFC mL ⁻¹)	P soluble (mg L ⁻¹)	Glucosa consumida (g L ⁻¹)
T1	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Serratia</i> sp. <i>Kosakonia</i> sp.	10,3 ± 0,0	2,3 ± 0,5 ^b	90,2 ± 4,8 ^a	0,9 ± 0,7 ^c
T1 Económico*	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Serratia</i> sp. <i>Kosakonia</i> sp.	10,5 ± 0,0	7,5 ± 0,3	94,7 ± 5,1	1,4 ± 0,1
T2	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Kosakonia</i> sp.	9,5 ± 0,1	6,0 ± 0,7 ^a	35,4 ± 14,6 ^b	8,3 ± 1,7 ^a
T3	<i>Serratia</i> sp. <i>Kosakonia</i> sp.	9,6 ± 0,1	2,7 ± 0,1 ^b	81,3 ± 4,5 ^a	5,9 ± 0,0 ^b
T4	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Serratia</i> sp.	7,9 ± 0,0	2,5 ± 0,2 ^b	96,7 ± 21,7 ^a	0,8 ± 0,2 ^c

Resultados promedio de dos réplicas con su respectiva desviación estándar. Los tratamientos resaltados en negrilla presentaron mayor concentración de P soluble en medio SMRS1-RP, y menor consumo de glucosa a las 72 horas de evaluación

* Económico se refiere al medio de cultivo SMRS1-RP formulado con componentes comerciales económicos y de fácil adquisición en el mercado. Este tratamiento no se tuvo en cuenta para las pruebas estadísticas.

3.3.6. Diseño del medio de cultivo para la producción de biomasa

El diseño del medio de cultivo se realizó para las bacterias en consorcio (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. y *Kosakonia* sp.), tomando como base los resultados obtenidos en las pruebas preliminares. Sin embargo, con uno de los cocultivos se obtuvieron resultados similares en cuanto a la liberación de P soluble y el bajo consumo de glucosa, razón por la cual se realizaron algunas pruebas en paralelo para el cocultivo (*Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp.) pero debido a que la investigación se centró principalmente en el consorcio, el desarrollo del bioinoculante a partir de este punto de la investigación se llevó a cabo usando las bacterias en consorcio.

En base a la Norma Técnica Colombiana 5148 del 2011 para Bioinsumos de Uso Agrícola - Inoculantes Biológicos, la cual establece como requisito específico que los inoculantes elaborados con microorganismos solubilizadores de fosfato deben tener una concentración mínima de cada microorganismo $\geq 1 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ durante el período de vigencia del producto, el criterio de selección se basó principalmente en mantener la población de BPS $> 10^7$ UFC mL⁻¹, ya que, si la concentración de biomasa es alta se podría garantizar la producción de ácidos orgánicos y la liberación de P soluble en el medio [64].

De acuerdo con los resultados del análisis de regresión, las variables de respuesta recuento de BPS y concentración de P soluble fueron estadísticamente significativas con $p=0,0101$ y $p=0,0014$ respectivamente, con lo cual se pudieron evaluar los efectos principales de los factores sobre estas variables. Los valores de R^2 fueron 0,812 y 0,712 respectivamente, con una correlación elevada entre los valores predichos y observados y con valores de precisión adecuada (10,8 y 6,0) superiores a 4,0, lo que confirma que los resultados no se deben a ruidos experimentales. En la **Tabla 3.4** se presentan los valores de significancia de los modelos, los factores (Prob>f), los efectos y porcentajes de contribución de cada factor.

En relación con el recuento de BPS el modelo fue significativo ($p=0,0101$), los factores influyentes fueron la concentración de hidrolizado de levadura cervecera y tiempo ($p= 0,00451$ y $p=0,0003$, respectivamente); de ellos el porcentaje de contribución más alto lo tuvo el tiempo (83,4 %), seguido por la fuente de nitrógeno (7,4 %). Para el tiempo el efecto fue negativo (-1,77), indicando que se podría trabajar con un nivel bajo (12 h) y para el nitrógeno el valor del coeficiente de regresión fue de -0,22, indicando que también podría trabajarse con el nivel bajo. Los factores roca fosfórica, glucosa, velocidad de agitación, porcentaje de inóculo y tiempo no fueron significativos sobre esta variable de respuesta ($p>0,05$).

Para la concentración de P soluble, los factores influyentes fueron la concentración de roca fosfórica, hidrolizado de levadura cervecera y tiempo ($p=0,0433$, 0,0410 y $p<0,0001$, respectivamente); de ellos el porcentaje de contribución más alto lo tuvo el tiempo (79,6 %), seguido por la roca fosfórica y fuente de nitrógeno (8,8 y 3,67 %). Para los tres factores los coeficientes de regresión fueron positivos indicando que se podría trabajar con el nivel alto de los mismos. Los factores glucosa, velocidad de agitación y porcentaje de inóculo no fueron significativos sobre esta variable de respuesta ($p>0,05$).

Tabla 3.4. Análisis de regresión para las variables de respuesta recuento de BPS y concentración de P soluble del diseño Plackett Burman

Recuento de BPS (Log_{10} UFC mL^{-1})					P soluble (mg L^{-1})				
Factor	Valor F	Prob>f	Efecto Stand.	% Contrib	Factor	Valor F	Prob>f	Efecto Stand	% Contrib
		p valor					p valor		
Modelo	7,6	0,0101	5,28		Modelo	13,92	0,0014	90,2	
A-Roca fosfórica (g L^{-1})	0,015	0,9050	0,033	0,0298	A-Roca fosfórica (g L^{-1})	4,43	0,0433	3,93	8,860
B-Glucosa (g L^{-1})	0,016	0,09051	0,032	0,298	B-Glucosa (g L^{-1})	0,51	0,4970	1,34	0,562
C-Nitrogeno (g L^{-1})	0,63	0,0451	-0,22	7,4	C-Nitrógeno (g L^{-1})	3,35	0,0410	3,41	3,67
D- Agitación (rpm)	0,001	1	0,001	0,3	D- Agitación (rpm)	1,56	0,251	2,33	1,71
E-Inóculo (%)	0,094	0,768	0,083	0,186	E-Inóculo (%)	1,10	0,328	1,96	1,21
F: Tiempo (h)	42,1	0,0003	-1,77	83,4	F: Tiempo (h)	72,58	<0,0001	15,90	79,64

Una vez se determinaron los factores influyentes y el porcentaje de contribución sobre el crecimiento de las BPS, se analizaron los resultados de los 12 tratamientos.

La **Fig. 3.4** presenta la comparación de medias entre los tratamientos (prueba Anova) para las variables de respuesta recuento de BPS (Log_{10} UFC mL^{-1}), P soluble liberado en el medio (mg L^{-1}) y glucosa residual (g L^{-1}). En los tratamientos T11 y T12 se obtuvo la mayor producción de biomasa ($8,1$ y $7,2$ Log_{10} UFC mL^{-1}), con $80,2 \pm 2,0$ y $60,8 \pm 2,6$ mg L^{-1} de P soluble, que aunque no son las concentración más altas de P soluble con respecto a otros tratamientos como T1 y T3 ($119,8 \pm 2,5$ y $109,0 \pm 3,8$ mg L^{-1}), en T11 y T12 se destaca la alta concentración de BPS que al estar viables pueden continuar con sus procesos metabólicos como la producción de ácidos en el medio de cultivo los cuales participan en la solubilización de P en 12 horas o menos, a diferencia de los tratamientos con tiempo de producción de 48 horas, especialmente T1 y T3 en los cuales se observó que la producción de biomasa fue inferior ($3,9$ y $2,5$ Log_{10} UFC mL^{-1}).

En general se observó que los tratamientos con tiempo de producción de 48 horas presentaron recuento de BPS inferior a los tratamientos a 12 horas, y de acuerdo con el ANOVA del diseño

PB es conveniente usar el nivel bajo de tiempo para la producción del bioinoculante. En relación al P soluble, la relación es inversa con respecto a la producción de biomasa y la concentración es mayor en los tratamientos a 48 horas con respecto a los tratamientos a 12 horas porque el tiempo de producción es 4 veces mayor; sin embargo mientras más tiempo transcurra menor va a ser la viabilidad de las BPS y el proceso de liberación de P soluble se vería afectado y el análisis de varianza del PB es consistente al indicar que es mejor usar tiempos cortos de producción que garanticen la viabilidad de las BPS para favorecer la liberación de P soluble.

En relación con la concentración de glucosa residual en T11 y T12 se obtuvieron los valores más bajos de todos los tratamientos ($1,2 \pm 0,0 \text{ g L}^{-1}$ y $0,9 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$) demostrando que el consorcio consumió eficientemente la fuente de carbono del medio y esto podría favorecer la producción de ácidos orgánicos. No obstante, en T12 se evaluó el nivel alto de glucosa lo que quiere decir que en T11 el uso de la glucosa fue más eficiente ya que en este último se evaluó el nivel bajo.

A diferencia de lo que indicó el análisis de regresión para este tratamiento, se empleó el nivel bajo de glucosa ($2,5 \text{ g L}^{-1}$), (factor no significativo $p = 0,09051$) debido a que al finalizar el tiempo de evaluación de T11 la glucosa no fue consumida en su totalidad, indicando que se podía usar el nivel bajo de este factor y el nivel alto de hidrolizado de levadura ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), (factor significativo $p = 0,0451$).

El análisis de regresión (**Tabla 3.4**) proporciono la información para determinar que el proceso de producción fue favorecido al usar el nivel bajo de la variable tiempo, para producir altas concentraciones de biomasa. El análisis ANOVA y la prueba de Tukey indicaron diferencias entre tratamientos en las variables biomasa, P soluble y glucosa residual. Tomando como variable respuesta principal el recuento de BPS, se seleccionó la formulación y condiciones de operación del T11: RP (Calboy®; <http://www.calboy.co>, 2018) (P_2O_5 25 %, CaO 32 %, SiO_2 14 %, Al_2O_3 0.5 % p/v) $5,0 \text{ g L}^{-1}$, glucosa $2,5 \text{ g L}^{-1}$, hidrolizado de levadura cervecera $0,5 \text{ g L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,5 \text{ g L}^{-1}$, KCl $0,2 \text{ g L}^{-1}$, MgSO_4 $0,3 \text{ g L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,004 \text{ g L}^{-1}$, FeSO_4 $0,0004 \text{ g L}^{-1}$ y NaCl $0,2 \text{ g L}^{-1}$, pH $7,2 \pm 0,2$, 30°C , 200 rpm, 10 % (v/v) de inóculo; para realizar las curvas de producción a 12 horas. Todos los componentes del medio seleccionado son empleados en la industria de alimentos, producción de fertilizantes inorgánicos y el hidrolizado de levadura es un subproducto de la industria cervecera colombiana.

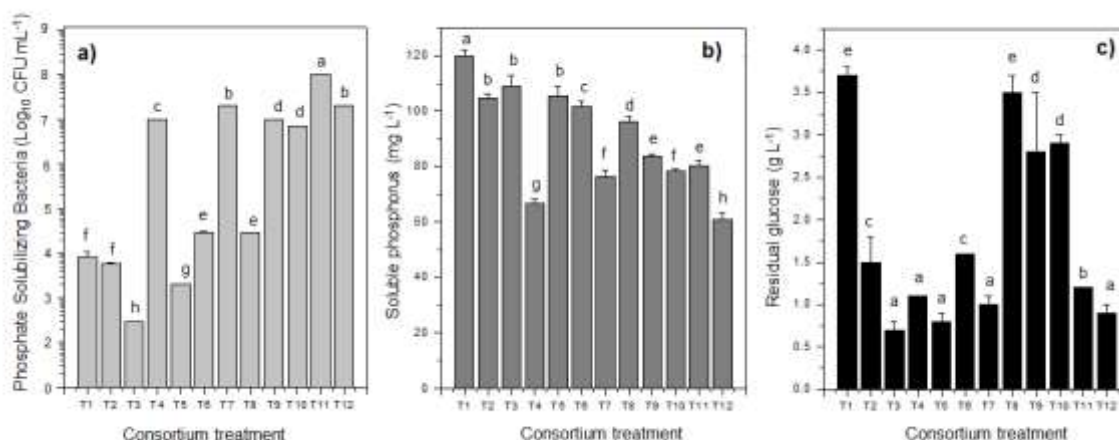


Figura 3.4. Diseño Plackett Burman con componentes económicos en función de cada tratamiento evaluado en el diseño experimental. Variables respuesta para el consorcio (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.) **a)** Recuento de BPS (Log₁₀ UFC mL⁻¹), **b)** Concentración de P soluble (mg L⁻¹), **c)** Glucosa residual (g L⁻¹); Las letras en las barras de las figuras indican las diferencias obtenidas en la prueba de Tukey. Los resultados son producto de dos réplicas con su respectiva desviación estándar. Las letras sobre las barras representan los subconjuntos heterogéneos de la prueba estadística de Tukey con diferencias altamente significativas ($p < 0,05$).

El resultado del análisis de costos para el medio del tratamiento T11 determinó que el costo de las materias primas para producir 1 L de medio MT11B fue 2 centavos de dólar (0,02 USD); valor 65 veces inferior a los componentes grado químico usados para producir 1 L de SMRS1 (1,3 USD). Convirtiéndose en una alternativa rentable para producción de inoculantes a base de BPS (Anexo 3.8.3 (Tabla 3.12)).

3.3.7. Curva de crecimiento en medio de cultivo MT11B

A partir del diseño experimental PB se diseñó y seleccionó un medio de cultivo para el consorcio de BPS (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. y *Kosakonia* sp). Este medio de cultivo se denominó MT11B y se usó para valorar el comportamiento de los dos bio inoculantes (consorcio: *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. y *Kosakonia* sp./cocultivo: *Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp.) en función del tiempo. Para este fin se realizaron las curvas de crecimiento que se presenta a continuación.

3.3.7.1. Consorcio (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. y *Kosakonia* sp.)

En la curva de crecimiento del consorcio no se observó fase de adaptación y la fase exponencial se prolongó hasta la hora 6, donde se observó máxima producción de biomasa con $10,6 \pm 0,078$ Log₁₀ UFC mL⁻¹ (Fig. 3.5). A continuación, se observó una ligera disminución de la biomasa hasta la hora 8 con $10,1 \pm 0,018$ Log₁₀ UFC mL⁻¹. La fase estacionaria inició a las 8 h de cultivo

y se prolongó hasta las 10 h, donde comenzó la fase de muerte y se prolongó hasta la hora 12, en donde el recuento bacteriano fue de $9,7 \pm 0,059 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$. En cuanto a la velocidad volumétrica de crecimiento (K_0) el valor determinado hasta las 6 h de cultivo fue de $4,4 \times 10^9 \pm 4 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con un tiempo de duplicación (T_d) de $0,052 \pm 0,012 \text{ h}$ (Tabla 3.5).

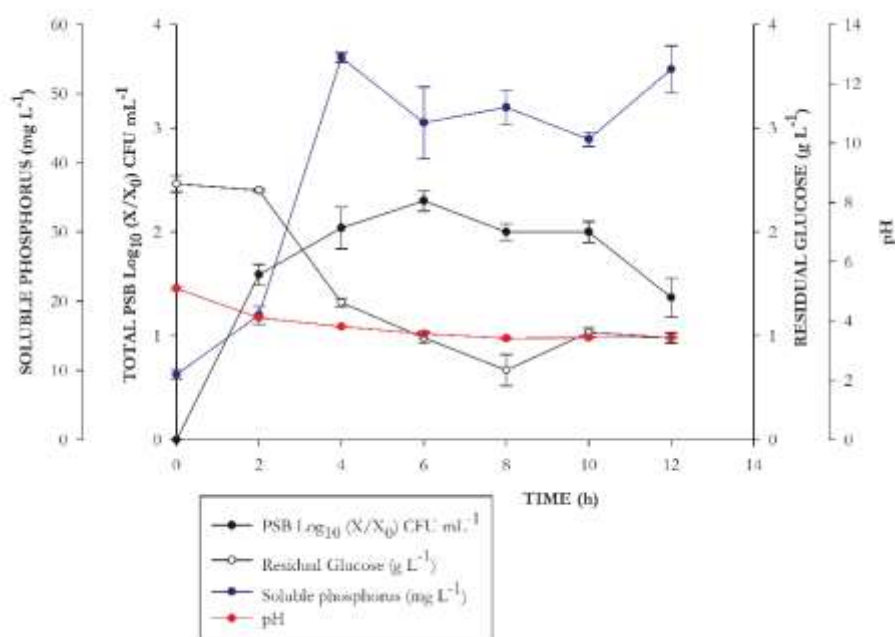


Figura. 3.5. Curva de crecimiento del consorcio en medio MT11B durante 12 h de cultivo. Condiciones de operación 30 °C, 200 rpm. Los resultados se presentan como la media de tres réplicas con su respectiva desviación estándar.

Tabla 3.5. Parámetros cinéticos de producción del bioinoculante (consorcio) en medio MT11B

Parámetro	Medio MT11B a las 6 h	Medio MT11B a las 12 h
K_0 ($\text{UFC mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$4,4 \times 10^9 \pm 4 \times 10^8$	ND
T_d (h)	$0,052 \pm 0,012$	ND
Y (Biomasa/glucosa) ($\text{UFC mL}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ L}^{-1}$)	$3 \times 10^{10} \pm 5 \times 10^9 \text{ a}$	$3 \times 10^9 \pm 5 \times 10^8 \text{ b}$
Y (P soluble/glucosa) (mg g^{-1})	$0,032 \pm 0,007 \text{ b}$	$0,054 \pm 0,003 \text{ a}$
Y (Ac. Glucónico/glucosa) (mg g^{-1})	0,461	ND
Y (Ac. Succínico/glucosa) (mg g^{-1})	0,054	ND
Y (Ac. Málico/glucosa) (mg g^{-1})	0,054	ND
Y (Ac. Cítrico/glucosa) (mg g^{-1})	0,024	ND
Y (Ac. Oxálico/glucosa) (mg g^{-1})	0,002	ND
P (Biomasa) ($\text{UFC mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$7 \times 10^9 \pm 1 \times 10^7 \text{ a}$	$4 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7 \text{ b}$
P (P soluble) ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$6,9 \pm 1,4 \text{ a}$	$4,5 \pm 0,3 \text{ b}$
P (Fosfatasa ácida) (UP h^{-1})	$0,380 \pm 0,013$	ND

P (Fosfatasa alcalina) (UP h ⁻¹)	0,625 ± 0,031	ND
P (Ac. Glucónico) (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	113,7	ND
P (Ac. Succínico) (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	13,4	ND
P (Ac. Máfico) (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	13,2	ND
P (Ac. Cítrico) (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	5,8	ND
P (Ac. Oxálico) (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	0,5	ND

ND (No determinado). Los resultados resaltados en negrilla corresponden al alto rendimiento y/o productividad obtenidos a las 6 h de producción del bioinoculante en medio MT11B. Las letras a y b representan los subconjuntos heterogéneos de la prueba estadística de Tukey con diferencias altamente significativas ($p < 0,05$).

La concentración inicial de glucosa en el medio MT11B fue de $2,46 \pm 0,077$ g L⁻¹ con un pH de $7,2 \pm 0,2$. Cuando se inoculó el consorcio en el medio estéril, el pH disminuyó a $5,09 \pm 0,064$. Probablemente, debido a los metabolitos producidos durante la producción del inóculo. La glucosa residual fue $0,98$ g L⁻¹ $\pm 0,05$ y un pH final de $3,4 \pm 0,025$ (Fig. 3.5).

La concentración más alta de P soluble (PS) liberado por el consorcio en el medio MT11B se obtuvo entre las 4 y 12 h de producción con valores de $55,2 \pm 0,695$ y $53,5 \pm 3,386$ mg L⁻¹, respectivamente. Dado que las BPS son las encargadas de producir metabolitos difusibles al medio, como fosfatasa y ácidos orgánicos para la liberación de P soluble (SP), se dedujo que cuanto mayor es el recuento de BPS, mayor es la cantidad de metabolitos para liberar P al medio.

Para determinar el tiempo óptimo de producción de bioinoculante se calculó el rendimiento de biomasa/sustrato, en donde se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las horas evaluadas, obteniendo $3 \times 10^{10} \pm 4 \times 10^3$ UFC mL⁻¹ g⁻¹ L⁻¹ a la hora 6 en comparación con la hora 12, en donde se obtuvo una unidad logarítmica menos con $3 \times 10^9 \pm 5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ g⁻¹ L⁻¹. En cuanto al P soluble en glucosa, este valor fue mayor a las 12 h ($0,048 \pm 0,001$ mg g⁻¹); ya que a esta hora el contenido de glucosa residual era menor que a las 6 h (Tabla 3.5). También se calculó el rendimiento de ácidos en glucosa. El ácido glucónico fue con el que se obtuvo mayor rendimiento ($0,461$ mg g⁻¹), seguido por el ácido succínico y málico cuyos rendimientos fueron 10 veces menores ($0,054$ y $0,54$ mg g⁻¹) que el ácido glucónico; por último el ácido cítrico y oxálico con rendimiento 20 y 200 veces menores que el ácido glucónico (Tabla 3.5). Adicionalmente, se calculó la productividad de la biomasa y el P soluble a las horas 6 y 12, obteniendo valores de $7 \times 10^9 \pm 1 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ h⁻¹, $4 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ h⁻¹, $6,9 \pm 1,4$ mg L⁻¹ h⁻¹ y $4,3 \pm 0,2$ mg L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Se determinó la productividad de fosfatasa

ácida y fosfatasa alcalina de $0,380 \pm 0,013$ y $0,625 \pm 0,031$ UP h⁻¹ para la hora con mayor producción de biomasa (Tabla 3.5).

Respecto a las productividades calculadas para los ácidos orgánicos, la mayor se obtuvo con el ácido glucónico debido a que este ácido fue significativamente superior y del que mayor concentración se obtuvo a las 6 horas de cultivo, seguido por el ácido succínico, málico, cítrico y oxálico (Tabla 3.5).

En cuanto a la curva de crecimiento del consorcio en medio SMRS1 usado como control, se realizó una comparación de las variables de respuesta obtenidas a la mejor hora de producción de biomasa en medio MT11B, observando diferencias en el recuento de BPS ($p < 0,05$) con $10,6 \pm 0,08$ (MT11B) y $12,3 \pm 0,37$ Log₁₀ UFC mL⁻¹ (SMRS1) a la hora 6 de cultivo. El consumo de glucosa fue superior en medio SMRS1 teniendo en cuenta que el cultivo inició con $9,2 \pm 0,83$ g L⁻¹ y a la hora 6 hubo consumo de $3,4$ g L⁻¹. La liberación de P soluble fue casi 4 veces mayor en medio SMRS1 ($154,7 \pm 3,54$ mg L⁻¹) con respecto a la concentración obtenida en medio MT11B debido a la diferencia en la fuente de P que en SMRS1 es de muy fácil solubilización. El pH fue mayor en SMRS1 a la hora 6 ($4,2 \pm 0,03$) (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Resultados del consorcio (6 h) a la hora de mayor producción de biomasa en la curva de crecimiento de 12 horas en medio MT11B y SMRS1. Condiciones de operación 30 °C, 200 rpm.

Parámetro	Consorcio	
	Medio MT11B a las 6 horas	Medio SMRS1 a las 6 horas
Biomasa (Log ₁₀ UFC mL ⁻¹)	$10,6 \pm 0,08$	$12,3 \pm 0,37$
Residual glucose (g L ⁻¹)	$1,0 \pm 0,06$	$5,8 \pm 0,65$
Soluble P (mg L ⁻¹)	$41,4 \pm 8,6$	$154,7 \pm 3,54$
pH	$3,6 \pm 0,01$	$4,2 \pm 0,03$

Los resultados son el promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar.

3.3.7.2. Cocultivo (*Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp.)

Para el cocultivo en medio MT11B el crecimiento exponencial se prolongó hasta las 8 h obteniendo $10,5 \pm 0,03$ Log₁₀ UFC mL⁻¹ y a esta misma hora inició la fase de muerte que se prolongó hasta la hora 12, en la cual el recuento finalizó en $9,5 \pm 0,02$ Log₁₀ UFC mL⁻¹. La concentración inicial de glucosa en el medio MT11B fue de $2,5$ g L⁻¹ y el pH de $7,2 \pm 0,2$. La glucosa residual finalizó en $0,3$ g L⁻¹ y el pH en $3,6 \pm 0,2$. Estos resultados sugieren que la disminución del pH podría deberse a la producción de ácidos orgánicos, producto del

metabolismo aeróbico de la glucosa. La mayor concentración de P soluble (SP), liberado por el cocultivo en medio MT11B, se obtuvo a las 12 horas con $88,1 \pm 0,32 \text{ mg L}^{-1}$ y presentó correlación positiva con la producción de biomasa hasta la hora 8, debido a que en ese tiempo se incrementaron las dos variables ($\rho=0,96$, $p<0,0012$). Por el contrario, el SP se correlacionó negativamente con el pH ($\rho= -0,90$, $p<0,0010$) y la glucosa residual ($\rho= -0,90$, $p<0,0017$), debido a que las BPS pueden aumentar la disponibilidad del P a través de procesos de solubilización de P inorgánico y mineralización de P orgánico usando varios mecanismos y combinaciones de los mismos, tales como disminución del pH, liberación de ácidos orgánicos y extrusión de protones partir de la RP (Fig. 3.6).

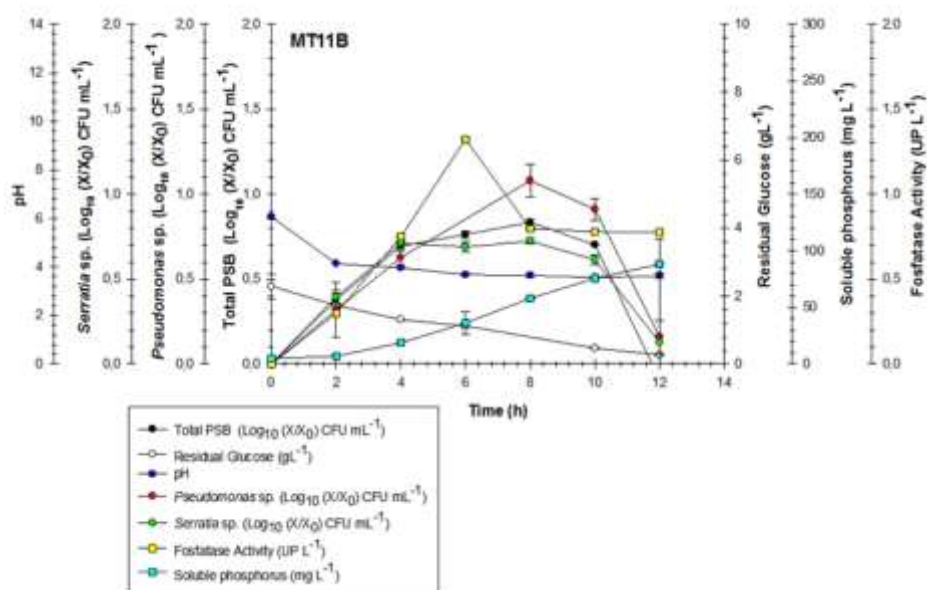


Fig. 3.6. Curva de crecimiento del cocultivo en medio MT11B durante 12 h de producción. Condiciones de operación $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 rpm. Los resultados se presentan como la media de tres réplicas con su respectiva desviación estándar.

En cuanto a la curva de producción del cocultivo en medio SMRS1, se observaron resultados similares a los obtenidos en el medio MT11B a la hora 8 para el recuento de BPS. No se observó fase de adaptación y el crecimiento exponencial se prolongó hasta esta misma hora; obteniendo $10,5 \pm 0,03 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$. La concentración de glucosa residual también fue similar en ambos medios y la liberación de P soluble a la hora 8 fue 4 veces mayor en medio SMRS1 ($264,7 \pm 10,7 \text{ mg L}^{-1}$) que en MT11B ($64,9 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$) debido a que la fuente de P del primero es de fácil solubilización en comparación con la RP como fuente de P del segundo. La concentración de P

soluble se correlacionó positivamente con el recuento de colonias ($\rho=0,98$, $p<0,0004$) y negativamente con la glucosa residual y pH ($\rho= -0,94$, $p<0,0016$), (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Resultados del cocultivo (8 h) a la hora de mayor producción de biomasa en la curva de crecimiento de 12 horas en medio MT11B y SMRS1. Condiciones de operación 30 °C, 200 rpm.

Parámetro	Cocultivo	
	Medio MT11B a las 8 horas	Medio SMRS1 a las 8 horas
Biomasa (Log_{10} UFC mL^{-1})	$10,4 \pm 0,01$	$10,5 \pm 0,03$
Glucosa residual (g L^{-1})	$1,3 \pm 0,01$	$1,6 \pm 0,08$
P soluble (mg L^{-1})	$64,9 \pm 0,2$	$264,7 \pm 10,7$
pH	$3,7 \pm 0,07$	$4,2 \pm 0,05$

Los resultados son el promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar.

Para determinar el tiempo óptimo de producción del bioinoculante compuesto por el cocultivo se calculó el rendimiento biomasa/glucosa en donde se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre las horas evaluadas, obteniéndose la concentración más alta a la hora 8 ($3 \times 10^{10} \pm 1 \times 10^{10}$ UFC mL^{-1}). La productividad para el P en solución fue de $7,3 \pm 0,03$ mg L^{-1} h^{-1} (Tabla 3.8).

Aunque la actividad fosfatasa en el cocultivo fue baja, se correlaciono positivamente con el recuento de colonias ($\rho=0,89$, $p<0,0096$) hasta la hora 6, y posiblemente favorecida por la fuente de P orgánico aportada por el hidrolizado de levadura cervecera a partir de la cual se pueden llevar a cabo procesos de mineralización (Fig. 3.6 y Tabla 3.8).

Una vez se determinó que en los dos medios de cultivo (MT11B y SMRS1) se obtenían los mayores recuentos de colonias a las 8 horas de cultivo, se realizó una comparación de medias entre los resultados de productividad y rendimientos de la biomasa en los dos medios (Tabla 3.8). En relación con la productividad para el recuento de colonias expresado como UFC mL^{-1} h^{-1} no se observaron diferencias significativas entre el medio MT11B y SMRS1 ($p>0,056$). La productividad volumétrica “basada en la actividad fosfatasa” en el medio MT11B fue de $0,21 \pm 0,01$ UP h^{-1} . La productividad de PS fue significativamente superior en el medio SMRS1 ($32,9 \pm 1,3$ mg L^{-1} h^{-1}) ($p<0,0079$). El valor obtenido en el medio MT11B fue $7,3 \pm 0,03$ mg L^{-1} h^{-1} .

En relación con el rendimiento de PS, con respecto a la concentración de glucosa consumida el resultado indicó diferencias significativas entre medios de cultivo obteniéndose el rendimiento más alto en el medio MT11B con un valor de $0,065 \pm 0,03$ mg g^{-1} de P liberado por g de glucosa

consumida ($p= 0,0018$). El valor en el medio SMRS1 fue de $0,044 \pm 0,002 \text{ mg g}^{-1}$. De acuerdo con los resultados de la **Tabla 3.8**, en términos de recuento de colonias y rendimiento de PS, el medio MT11B podría ser un medio alternativo al caldo SMRS1 para el cocultivo de las BPS *Pseudomonas* sp., y *Serratia* sp., con 8 horas de producción.

Tabla 3.8. Parámetros cinéticos del cocultivo en medios MT11B y SMRS1 a las 8 h de evaluación.

Parámetro	Medio MT11B a las 8 h	Medio SMRS1 a las 8 h
P _(biomasa) (UFC mL ⁻¹ h ⁻¹)	$3 \times 10^9 \pm 7 \times 10^{7a}$	$4 \times 10^9 \pm 3 \times 10^{8a}$
Actividad fosfatasa* (UP)	$1,3 \pm 0,04$	ND
P _{(fosfatasa)*} (UP h ⁻¹)	$0,21 \pm 0,01$	ND
P _(P soluble) (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	$7,3 \pm 0,03^b$	$32,9 \pm 1,3^a$
Y _(P soluble/glucosa) (mg g ⁻¹)	$0,065 \pm 0,03^{a**}$	$0,044 \pm 0,002^b$
Y _(P soluble/UFC) (mg L ⁻¹ UFC ⁻¹ mL ⁻¹)	$2 \times 10^{-12} \pm 5 \times 10^{-14} b$	$4 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-3} a$

ND (No determinado). Las letras a y b se relacionan con diferencias significativas obtenidas en la prueba de Tukey. Los resultados en negrilla fueron estadísticamente diferentes y significativos.

*La actividad y la productividad de la fosfatasa se calculó a la hora 6.

Entre los dos bioinoculantes (consorcio y cocultivo) el rendimiento biomasa/glucosa fue similar, lo que indica un consumo más eficiente de la glucosa por parte del consorcio ya que se necesitaron dos horas menos de producción para obtener una concentración de biomasa similar a la del cocultivo. Un comportamiento similar se observó al calcular la productividad de la biomasa en donde se obtuvieron valores similares para consorcio (6 h) y cocultivo (8 h) pero con dos horas de diferencia en la producción ($3 \times 10^{10} \pm 5 \times 10^9$ y $3 \times 10^9 \pm 7 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ h⁻¹ L⁻¹ respectivamente) (**Tabla 3.5 y 3.8**).

3.3.8. Caracterización del bioinoculante producido con el consorcio en medio MT11B

A partir de las curvas de crecimiento del consorcio y el cocultivo se calcularon los parámetros cinéticos con los que se determinaron mayores rendimientos y productividades al trabajar con el consorcio, puesto que el tiempo de producción es 2 horas más corto que el cocultivo. Por esta razón se definió como bioinoculante principal de esta investigación el compuesto por el consorcio y la caracterización física, química y microbiológica que se presenta a continuación corresponde al mismo.

3.3.8.1. Caracterización química y microbiológica

La caracterización química y microbiológica del bioinoculante se presentan en la **Tabla 3.9**. Con respecto al recuento total de BPS que contiene el bioinoculante, se obtuvo una concentración

del consorcio bacteriano de $1,1 \times 10^{13}$ UFC mL⁻¹. En cuanto a los recuentos de las bacterias por morfotipos las concentraciones fueron similares para las tres bacterias con $6,2 \times 10^{12}$, $3,3 \times 10^{12}$ y $5,0 \times 10^{11}$ UFC mL⁻¹ para *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp., respectivamente. La actividad enzimática fue $2,3 \pm 0,08$ UP y $3,8 \pm 0,13$ UP para fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina. Las concentraciones de P total (PT) y PS fueron 354 mg L⁻¹ y $45,8 \pm 5,170$ mg L⁻¹. Esta composición del bioinoculante permitió que las tres BPS que conforman el consorcio se mantienen viables en igual proporción en el bioinoculante hasta el final de la producción (6 h) y las altas concentraciones de BPS garantizan la actividad fosfato solubilizadora del producto ya que al estar viables se da continuidad a la producción de ácidos y fosfatasas que participan en el proceso de solubilización de P.

Tabla 3.9. Recuento de BPS, actividad enzimática volumétrica y concentración de fósforo en el bioinoculante compuesto por el consorcio en medio MT11B.

Composición	Valor
Recuento total de BPS	$1,1 \times 10^{13}$ UFC mL ⁻¹
Recuento de <i>Pseudomonas</i> sp.	$6,2 \times 10^{12}$ UFC mL ⁻¹
Recuento de <i>Serratia</i> sp.	$3,3 \times 10^{12}$ UFC mL ⁻¹
Recuento de <i>Kosakonia</i> sp.	$5,0 \times 10^{11}$ UFC mL ⁻¹
Actividad fosfatasa ácida	$2,3 \pm 0,08$ UP
Actividad fosfatasa alcalina	$3,8 \pm 0,13$ UP
Fósforo total	354 mg L ⁻¹
Fósforo soluble	$45,8 \pm 5,170$ mg L ⁻¹
pH	$3,57$

3.3.8.2. Pruebas de estabilidad de la biomasa del bioinoculante a diferentes temperaturas y pH

Dos de los factores que afectan la estabilidad del bioinoculante son la temperatura y el pH. Se determinó que el rango de temperatura al cual es estable el producto es entre 8 y 30 ± 2 °C, con porcentajes de estabilidad de las poblaciones bacterianas superiores al 80 % (Fig. 3.7a). En cuanto a la estabilidad a pH se determinó que los pH a los cuales las BPS fueron menos sensibles, se encontraban en los valores de 4,0 y 6,0. Sin embargo, los porcentajes de estabilidad de las poblaciones bacterianas para esta variable fueron inferiores al 68 % (Fig. 3.7c).

De acuerdo a la información obtenida en el análisis de varianza ANOVA, se observaron diferencias significativas entre las temperaturas evaluadas ($p=0,0000$) para la variable recuento de BPS. El recuento inicial fue de $10,6 \pm 1,078$ Log₁₀ UFC mL⁻¹. Las poblaciones de BPS presentaron una estabilidad del 90 % a $8,0 \pm 2,0$ °C con recuento de $8,6 \pm 0,817$ Log₁₀ UFC mL⁻¹.

¹, 95 % a 20 ± 2 °C con recuentos de $10,6 \pm 1,739$ Log₁₀ UFC mL⁻¹ y 100 % a 30 ± 2 °C con recuentos de $11,6 \pm 0,336$ Log₁₀ UFC mL⁻¹ (**Fig. 3.7a**).

La concentración inicial de P soluble en la prueba de estabilidad a temperatura fue de $35,5 \pm 2,184$ mg L⁻¹. De acuerdo al ANOVA, se observaron diferencias significativas ($p=0,0001$), y la prueba de Tukey mostró las mayores concentraciones a las temperaturas $40, 30$ y 50 ± 2 °C con $54,2 \pm 3,088$, $51,6 \pm 1,068$ y $51,213 \pm 4,151$ mg L⁻¹, respectivamente (**Fig. 3.7b**).

El recuento inicial fue de $10,5 \pm 0,142$ Log₁₀ UFC mL⁻¹. En relación con la evaluación de la estabilidad de las poblaciones bacterianas a diferentes pH, se presentó disminución en todos los pH evaluados. A pH 4,0 y $6,0 \pm 0,2$, la estabilidad fue de 64 y 68 %, con recuentos de $6,8 \pm 0,408$ y $7,2 \pm 0,009$ Log₁₀ UFC mL⁻¹, respectivamente (**Fig. 3.7c**). De acuerdo con el ANOVA, se observaron diferencias significativas ($p<0,001$), mayor la estabilidad se obtuvo a pH 4,0 y $6,0 \pm 0,2$.

La concentración inicial de P soluble en la prueba de estabilidad a pH fue de $29,5 \pm 2,860$ mg L⁻¹ y se observaron diferencias significativas ($p<0,001$), obteniéndose el menor valor a pH $4,0 \pm 0,2$ con $40,6 \pm 3,510$ mg L⁻¹ (**Fig. 3.7d**).

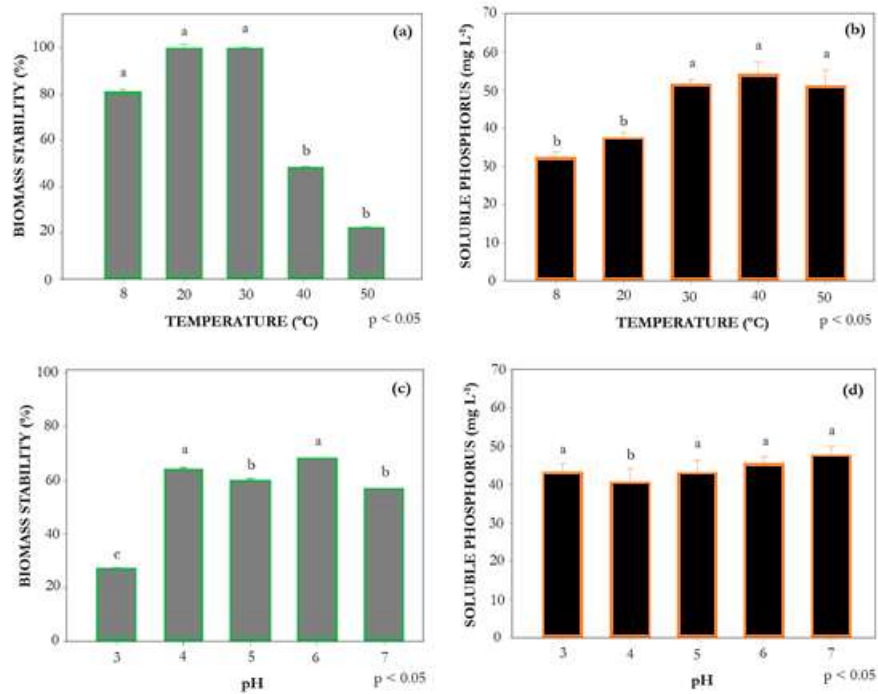


Figura 3.7. Estabilidad de la biomasa a diferentes temperaturas y pH. **(a)** Porcentaje de estabilidad de la biomasa a diferentes temperaturas. **(b)** Concentración de P soluble a diferentes temperaturas. **(c)** Porcentaje de estabilidad de la biomasa a diferentes pH. **(d)** Concentración de P soluble a diferentes pH. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Las letras sobre las barras representan subconjuntos heterogéneos según la prueba de Tukey con diferencias altamente significativas ($p < 0,05$).

3.3.8.3. Concentración enzimática y actividad volumétrica

El experimento de concentración enzimática y actividad volumétrica se realizó con el fin de caracterizar las enzimas fosfatasa ácida y fosfatasa alcalinas, las cuales participan en el proceso de mineralización de P_o y son producidas por las BPS como uno de los mecanismos para la solubilización de las formas orgánicas no disponibles de P presentes en el medio.

El sobrenadante obtenido en este experimento se obtuvo por centrifugación del bioinoculante. Para la concentración de enzimas fosfatasa, el volumen inicial fue de 0,85 L con actividad enzimática de $3,6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ de fosfatasa ácida y $3,0 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ de fosfatasa alcalina (Fig. 3.8). En el concentrado final, la actividad fosfatasa ácida disminuyó a $2,3 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, mientras que la actividad fosfatasa alcalina aumentó a $3,8 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, el pH se mantuvo estable a $3,6 \pm 0,2$ y el volumen disminuyó de 0,8 a 0,07 L.

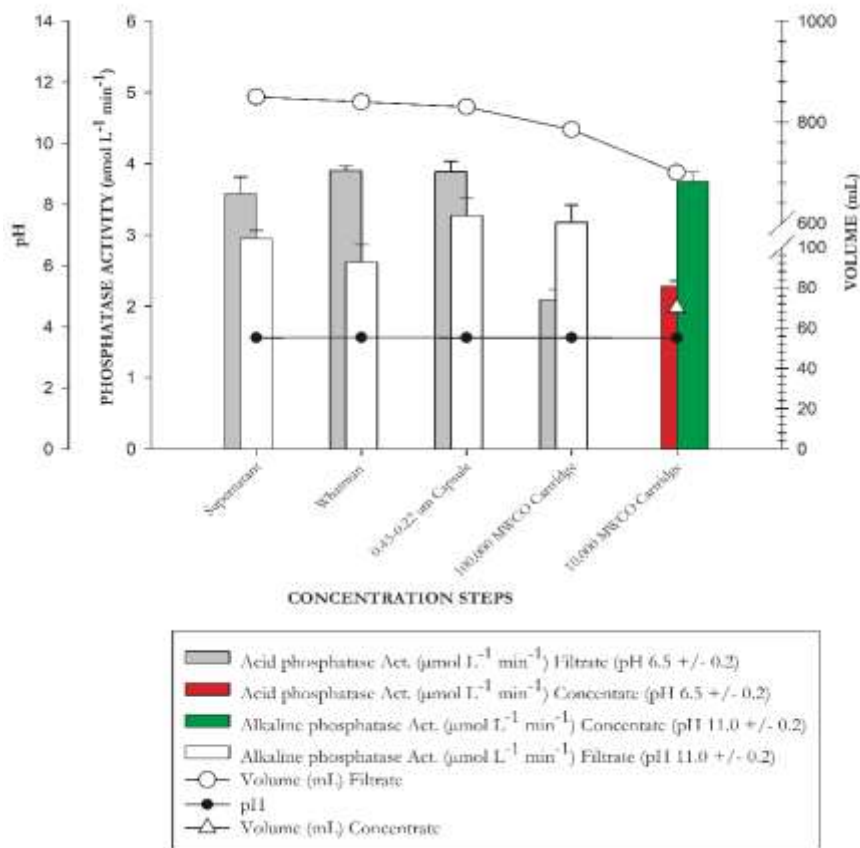


Figura 3.8. Concentración del sobrenadante de consorcio para detectar la actividad fosfatasa ácida y alcalina.

3.3.8.4. Producción de ácidos orgánicos del consorcio y solubilización de fósforo de roca fosfórica con ácidos orgánicos producidos comercialmente

Se detectaron ácido glucónico, oxálico, cítrico, málico y succínico. Las concentraciones de los ácidos producidos por el consorcio a las 6 horas de cultivo se muestran en la [Tabla 3.10](#). El ácido glucónico se produjo en mayor concentración (682,0 mg L⁻¹), seguido por el succínico, el málico, el cítrico y el oxálico (80,3, 79,2, 34,8 y 3,1 mg L⁻¹, respectivamente).

Al determinar la concentración de P liberado por los ácidos orgánicos comerciales en concentraciones producidas por el bioinoculante, el mayor valor se presentó con ácido glucónico a los 180 minutos con una concentración de 66,3 ± 2,6 mg L⁻¹. La concentración de ácido glucónico liberado bajo las condiciones de producción del bioinoculante a las 6 horas de cultivo representa el 76,6 % de la totalidad de los ácidos producidos y cuantificados en el consorcio de BPS ([Tabla 3.10](#)).

Tabla 3.10. Concentración de ácidos orgánicos producidos por el consorcio bacteriano y P soluble liberado a partir de RP Calboy® mezclada con los ácidos encontrados.

Ácido	Concentración de ácidos producidos por el consorcio (mg L ⁻¹) a las 6 h	P soluble liberado (mg L ⁻¹) de la RP (11% de P elemental)		
		60 minutos	120 minutos	180 minutos
Glucónico	682,0 (77,6 %)	58,5 ± 4,0	61,4 ± 2,3	66,3 ± 2,6
Succínico	80,3 (9,1 %)	20,5 ± 0,9	22,1 ± 1,4	27,1 ± 1,8
Málico	79,2 (9,0 %)	28,9 ± 1,6	27,8 ± 3,7	29,8 ± 3,0
Cítrico	34,8 (4,0 %)	18,6 ± 1,9	21,4 ± 0,7	31,5 ± 1,8
Oxálico	3,1 (0,4 %)	4,6 ± 1,2	2,8 ± 0,6	4,0 ± 0,5

*Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3.8.5. Caracterización morfológica y análisis semicuantitativo de la RP con y sin BPS

Las observaciones MEB revelaron las características morfológicas de las superficies minerales de la RP antes de ser adicionada al medio de cultivo y posterior a la producción del bioinoculante después de 6 horas de producción. Las imágenes MEB de las **Fig. 3.9a, b y c** muestran la morfología y las características superficiales de la RP inicial, antes de ser incorporada como componente del medio de cultivo MT11B, en aumentos de 1.000, 6.000 y 10.000 X, en donde se observó la superficie irregular de la RP, compuesta por aglomerados con tamaños que varían entre 1 a 10 µm.

En las **Fig. 3.9d, e y f** se observa la RP luego de 6 h de producción del bioinoculante en medio MT11B con el consorcio de BPS, en donde las bacterias se encuentran agrupadas sobre la superficie de la RP formando aglomerados de bacterias entrelazadas, dispuestas sobre la superficie del material formando biopelícula, que ocurren debido a la estructura heterogénea superficial de la RP que permitió la adherencia de las BPS al material. (**Fig. 3.9d, e y f**)

En relación con los análisis de EDS para la RP inicial, los porcentajes en peso obtenidos fueron para C 9,3 ± 0,4 %, O 52,0 ± 1,7 %, Al 1,0 ± 0,5 %, Si 21,0 %, P 10,6 ± 0,8 % y Ca 23,8 ± 3,3 %.

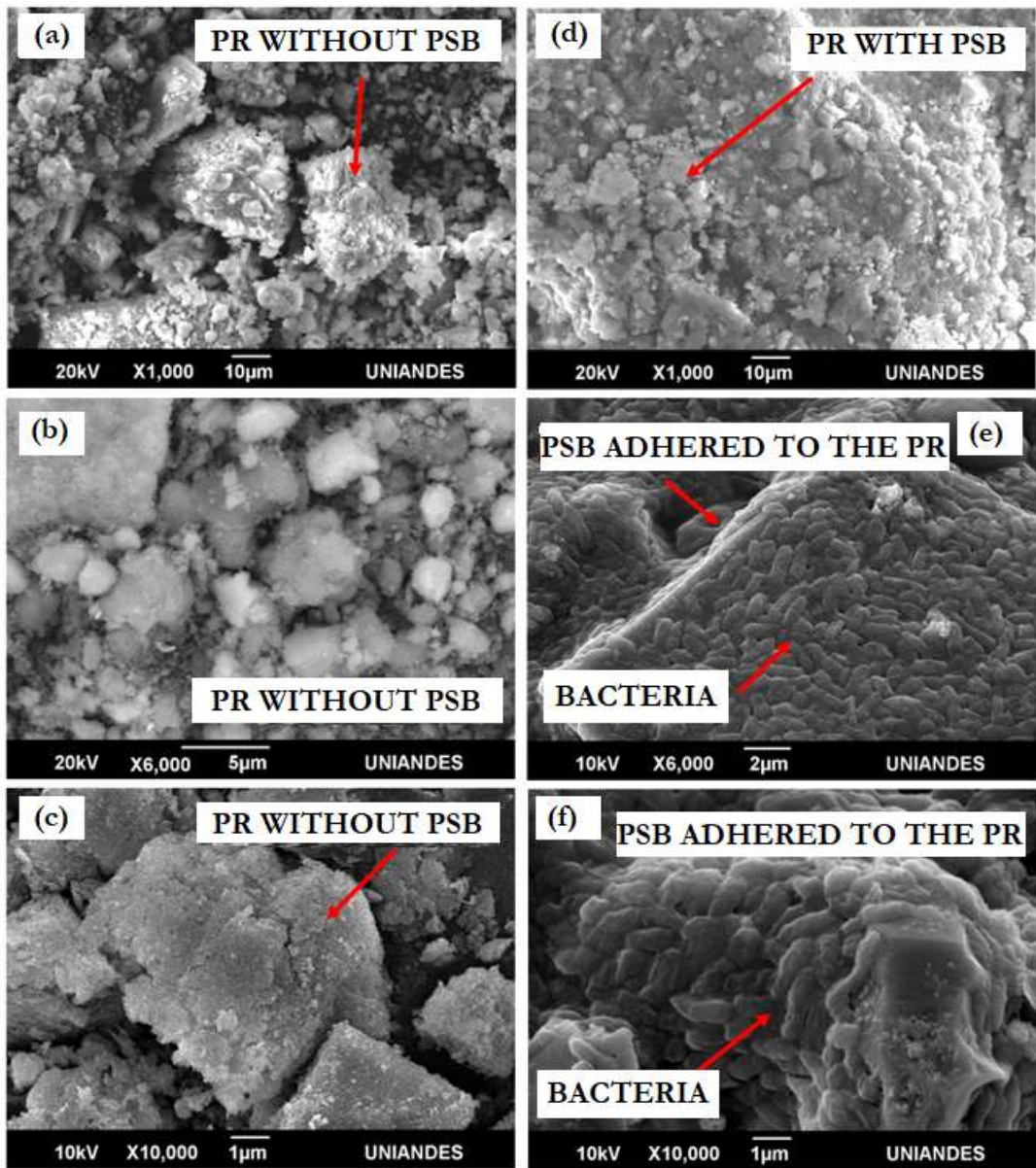


Figura 3.9. Roca fosfórica (RP) pre y pos tratada con bacterias fosfato solubilizadoras (BPS). **a)** **b)** y **c)** MEB RP inicial sin BPS. **d)** **e)** y **f)** RP después de 6 horas de tratamiento en medio MT11B que contenía BPS, a diferentes magnificaciones (1,000 X, 6,000 X and 10,000 X).

3.4. Discusión

3.4.1. Muestreo de suelo y aislamiento de bacterias fosfato solubilizadoras

Ortega (2013) define la agricultura de precisión, como el uso de las tecnologías de la información para la toma de decisiones técnica, económica y ambientalmente adecuadas para la producción de cultivos [65]. En el sitio de Punta Larga se presentaron dos parámetros (BPS y pH) con autocorrelación significativa y por tanto, con dependencia espacial. Jaramillo (2012) indica que se tiene una variable con dependencia espacial cuando el valor que toma una propiedad en un sitio depende de la distancia y/o de la dirección en la cual se ubica con respecto a otro sitio vecino [66]. El coeficiente de correlación cuantifica la asociación que existe entre dos variables, es decir, cuanto de la variabilidad de una es explicada por la variabilidad de la otra [67]. Contrario a lo ocurrido en Pesca donde los puntos muestreados presentaron independencia absoluta en las variables (Anexo 3.8.1 (Fig. 3.10)). Esto es de gran importancia para futuros estudios de la zona de Pesca, ya que el modelo establece que esta dependencia espacial es hasta los 14 m suponiendo un mayor esfuerzo de muestreo para parámetros microbiológicos y aún menor distancia entre puntos para el lugar de Pesca. Pocos estudios han estimado la variabilidad microbiológica en suelos mediante la utilización de estas técnicas; sin embargo, el nivel resolutivo y la confiabilidad de los datos hacen que estos análisis se vuelvan llamativos y de interés para el sector agrícola.

Cristobal *et al.*, (2008) afirma que el pH es una de las propiedades químicas del suelo que menos varía, debido a que es una característica intrínseca de la génesis del suelo y el CV fluctúa de 2 a 15 %, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Mientras que los nutrientes como el P la variabilidad puede ser mayor debido a que es una variable altamente dependiente de las condiciones de manejo del suelo [68]. Geoderma *et al.*, (2019) y Lan *et al.*, (2018) afirman que las propiedades físico químicas del suelo influyen en las comunidades bacterianas del suelo [69,70]. Los resultados de esta investigación no mostraron gran variación en el recuento de BPS entre los puntos de muestreo de los dos lugares evaluados (Punta Larga y Pesca) y los recuentos fueron similares a los obtenidos por Zhang *et al.*, (2020) quienes encontraron en su estudio que un alto contenido de P total en el suelo puede estimular las poblaciones de BPS [71]. En relación al pH del suelo, en este estudio se observó en términos generales que los puntos de muestreo en los que el pH tiende a la alcalinidad se presentaron los recuentos más bajos y en los puntos en donde el pH tiende a la neutralidad el recuento de BPS fue superior. Lo que coincide con el estudio de Khan & Joergensen (2009) quienes estudiaron la aparición y los mecanismos de las

BPS y su papel en la producción de cultivos, encontrando que un aumento en el pH del suelo puede disminuir la tasa de solubilización de P debido a la disminución de BPS [72].

Por otro lado, con estos muestreos se pueden aislar un gran número de bacterias propias de la zona de estudio, que se encuentran adaptadas a este tipo de suelos, la competencia con otros microorganismos es menor y se favorece el establecimiento de las mismas al introducirlas nuevamente como un bioinoculante a estos mismos suelos, ya que de acuerdo con [Pereira, et al \(2021\)](#) el uso de aislamientos autóctonos puede aumentar el éxito de la bioinoculación bajo condiciones ambientales estresantes ya que las bacterias presentan un grado de adaptación superior [73]. Los bioinoculantes con cepas nativas se desarrollan con una o varias cepas. Sin embargo, los cocultivos o consorcios son más llamativos porque pueden tener diferentes actividades biológicas, se complementan entre sí y su efecto benéfico en suelo y para la planta es superior. Sin embargo, se deben emplear técnicas de tamizaje para seleccionar las que tengan mayor potencial como bioinoculante [44,74].

La producción de bioinoculantes y su aceptación por parte de los productores agrícolas están estrechamente relacionadas, pues la actividad agrícola impulsa la investigación para desarrollar nuevos insumos, que también promueve la innovación tecnológica, que tienda a maximizar los ingresos económicos de los agricultores [75]. Para su aceptación, es necesario garantizar la calidad del bioinoculante, suministrando productos biológicamente estables [76]. Además, deben cumplir con el propósito para el que fueron diseñados y que no contengan microorganismos patógenos para humanos, plantas y animales [64]. La eficacia de los microorganismos que componen el bioinoculante es lo más importante para la producción de bioinsumos y es la esencia de los productos biológicos para el desarrollo de la agricultura, por lo tanto, la selección de cepas es un criterio primordial [77,78].

Bacterias como *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. y *Kosakonia* spp. pueden aislarse de suelos en los cuales se cultivan diferentes plantas como pastos (*Miscanthus sinensis*, *Lolium perenne*), maíz (*Zea mays*), vainilla (*Vanilla planifolia*) y cebolla (*Allium cepa*), [9,79–84]; siendo el último cultivo del que menos reportes se tiene y del que no se conoce mucho acerca del efecto de estas bacterias sobre la solubilización de fósforo y la disponibilidad de este elemento, para el crecimiento y desarrollo de la hortaliza. Varios autores han reportado géneros como *Pseudomonas*, *Serratia* y

Enterobacter, como productores de ácido cítrico, láctico, succínico, glucónico, oxálico, glutámico, pirúvico, entre otros, que provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular como la glucosa a través de la ruta de oxidación directa y favorecen la solubilización de P [8,17,29,85]. De acuerdo con Beltrán (2014), los ácidos orgánicos pueden causar la liberación de grandes cantidades de P soluble a partir de fosfatos minerales debido a que se proporcionan protones y aniones que se unen a los metales liberando el P [86]. También se tienen reportes de la capacidad de los tres géneros para solubilizar fósforo inorgánico (fosfato tricálcico y RP), mineralizar fósforo orgánico (actividad fosfatasa), producir sustancias promotoras de crecimiento vegetal y sustancias para control biológico de fitopatógenos rizosféricos [19,20,81,83,87,88]. Aunque de Kosakonia hasta el momento son pocos los reportes como bacteria fosfato solubilizadora, se sabe que este género está estrechamente relacionado con la familia Enterobacteriaceae, mostrando una alta homología con la secuencia del gen 16S rDNA [89,90]. En este estudio, los resultados del análisis taxonómico de *Kosakonia* sp., aislada de suelo en donde se cultiva *A. cepa* L., indicaron que tiene 99 % de identidad en el 100 % de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a *Kosakonia cowanii*. Gao et al, (2020) reportan *Kosakonia cowanii* como promotora de crecimiento de plantas y en su estudio evalúan el exopolisacárido producido por esta bacteria, obteniendo efectos positivos en la germinación de semillas y vigor en el crecimiento de plantas de maíz [84]. Brady et al, (2013), mencionan que algunas especies de *Kosakonia* se aíslan de fuentes ambientales incluyendo suelo y plantas, y que tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal mediante la fijación de nitrógeno [90]. Berger et al, (2018), reportan a *Kosakonia pseudosacchari* como endófita promotora de crecimiento vegetal en cultivo de maíz [91]. Barrera et al, (2019), reportan a *Kosakonia radicincitans* como endófita promotora de crecimiento, con capacidad de solubilizar fósforo y con actividad fosfatasa ácida y alcalina [92]. Diferentes especies de BPS han sido aisladas de rizosfera de palma (*Elaeis guineensis* Jacq.) [36], chontaduro (*B. gassipaes kuntb*) [35], café (*Coffea arabica*) [59], uchuva (*Physalis peruviana* L.) [93] y cebolla cabezona (*Allium cepa* L.) [41,44].

A partir de los 37 muestreos se recuperaron 52 colonias de BPS, un valor alto para incluirlas a todas como parte de un bioinoculante. Es por esto que, al realizar las pruebas de selección, el número fue disminuyendo hasta obtener tres aislamientos provenientes de las pruebas preliminares de solubilización que presentaron recuentos $> 1,0 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, liberaron más de 48 mg L⁻¹ de P soluble (PS) en medio SMRS1-RP a las 72 horas de cultivo y no fueron

antagónicas entre ellas, cumpliendo con las características de selección definidas en este estudio. Las bacterias no presentaron actividad deoxirribonucleasa (E.C. 3.1.21) lo que indica la incapacidad de producir enzimas que hidrolicen los enlaces fosfodiéster del DNA. Tampoco se obtuvieron zonas de aclaramiento por hemólisis en agar sangre determinando que no hubo oxidación de hemoglobina ni lisis de la membrana de los glóbulos rojos en el sustrato de crecimiento. La hemólisis puede manifestarse de tres formas diferentes: alfa (α), cuando se presenta lisis parcial de la membrana de los glóbulos rojos produciendo una decoloración verde o marrón en el medio; beta (β), asociada a una lisis completa de los glóbulos rojos en la que se produce un halo amarillo o transparente alrededor de la colonia; y gamma (γ), que indica la ausencia de hemólisis. Estos resultados fueron relevantes para corroborar la naturaleza no patógena de las bacterias evaluadas debido a que la información suministrada por estas dos últimas pruebas es difícil de obtener en otros medios de cultivo (Fig. 3.4), [94–96].

Las bacterias produjeron ácido glucónico, succínico, málico, cítrico y oxálico que permitieron solubilizar el P a partir de RP como fuente de P inorgánico [44]. En este estudio, los tres aislamientos con los cuales se conformaron el consorcio y el cocultivo presentaron IS similares; sin embargo, las concentraciones de PS presentaron variación en medio líquido, dado que la cantidad de P soluble liberado está influenciada por el tipo de ácido producido, la estructura química, el peso molecular y la velocidad de difusión, que puede variar entre las bacterias [8,19,41,44]. Al emplear las bacterias en consorcio y cocultivo se puede incrementar y complementar, su potencial como bioinoculante. Obteniendo un producto apto para la comercialización a menor costo y con mayores beneficios para el suelo y la planta comparado con la fertilización química al 100 % [2,80,87]. Por estas razones, surgió el interés en caracterizar las tres bacterias aisladas de suelos subtropicales y evaluar su uso como bioinoculante en cultivos de *A. cepa* L.

3.4.2. Índice de solubilización e interacciones

Para desarrollar un biofertilizante en consorcio o cocultivo se debe garantizar que cada bacteria mantenga su actividad biológica y que no se generen efectos antagónicos entre ellas. Ya sea durante la producción del bioinoculante o durante su aplicación en semillero, invernadero y campo [22,97,98]; lo cual se comprobó al estimar el IS, al realizar las pruebas preliminares de solubilización en medio líquido y al evaluar la interacción en medio sólido.

Las tres bacterias solubilizaron P de la RP en 5 g L^{-1} como concentración inicial de RP, tanto en medio sólido como en medio líquido, al generar la disminución del pH, debido a la producción de ácidos orgánicos como ácido glucónico, oxálico, cítrico y málico, que participan en la solubilización de P de RP [4,19,20]. Todos los ácidos son solubles en agua y son excretados al exterior de la célula y son producidos durante el metabolismo de azúcares como glucosa, fructuosa, sacarosa, maltosa, entre otros [8,23,24]. Varios autores han reportado resultados similares a los de este estudio al tratar de correlacionar los resultados de la técnica de SI en medio sólido con la cuantificación de P soluble en medio líquido, y concuerdan en que la selección de las bacterias no sólo debe hacerse por el IS, sino que deben tenerse en cuenta otros criterios como la concentración del elemento soluble, la cantidad de biomasa y la concentración de ácidos orgánicos producidos [19,20,22,99–101]. Bajo las condiciones de experimentación evaluadas en las pruebas de interacción de Gauze, ninguno de los aislamientos produjo sustancias difusibles al medio que causara inhibición de la otra y que pudiera asociarse con un posible amensalismo por la producción de antibióticos, enzimas hidrolíticas o bacteriocinas siendo un resultado favorable ya que las tres pudieron formularse como consorcio y cocultivo [102].

Pseudomonas sp., *Serratia* sp. y *Kosakonia* sp. al ser cultivados en RP, obtuvieron IS y concentraciones de PS similares a los reportados en otros trabajos en los que se utilizó fosfato tricálcico como fuente de fósforo [20,24,81]; demostrando que a pesar de ser una de las fuentes de P de más difícil solubilización, fue posible solubilizar el fósforo y obtener altas concentraciones de biomasa [9,24,82]. Los análisis HPLC indicaron que las BPS produjeron ácido glucónico ($682,0 \text{ mg L}^{-1}$), succínico ($80,3 \text{ mg L}^{-1}$), málico ($79,2 \text{ mg L}^{-1}$), cítrico ($34,8 \text{ mg L}^{-1}$) y oxálico ($3,1 \text{ mg L}^{-1}$) en el medio MT11B. Al igual que varios de los ácidos producidos por las BPS de este estudio, Behera *et al.*, (2017) reportaron la presencia de varios ácidos orgánicos, como el ácido málico, ácido láctico y acético producidos por *Serratia* sp. [20]. Alam *et al.*, (2002) reportaron ácido cítrico, oxálico, acético y glucónico en caldo de cultivo de microorganismos solubilizadores de fósforo [103].

La glucosa es uno de los componentes principales del medio de cultivo MT11B, y las BPS tienen preferencia por la glucosa como fuente de carbono para producir ácidos orgánicos, los cuales pueden incrementar la disponibilidad de P en el suelo [25]. Suleman *et al.*, (2018) indicaron que el ácido glucónico es el ácido orgánico más frecuente producido por las BPS por mediación de

la enzima glucosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.5.2.) y por la presencia del cofactor pyrroloquinoline quinone (PQQ) en la vía de oxidación directa de la glucosa [19,104,105]. Una vez se forma el ácido glucónico, puede ser oxidado a otro intermediario que es el ácido 2-cetoglucónico. Los dos productos son ácidos carboxílicos fuertes que pueden liberar iones de la superficie del mineral por intercambio aniónico o por quelación de cationes unidos a los grupos fosfato [8,23,97]. Lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, en donde la mayor concentración de ácido producido por el consorcio fue el glucónico con 77,6 % del 100 % de los ácidos cuantificados en el medio a las 6 horas de cultivo y esta concentración máxima obtenida se relaciona con la máxima concentración de P soluble liberado cuando se usó el ácido glucónico comercial en el ensayo de solubilización de P de RP ($66,3 \pm 2,6 \text{ mg L}^{-1}$) a los 120 minutos (Tabla 3.10). Sin embargo, al igual que lo reporta De Oliveira *et al.*, (2020), ácidos como el oxálico pueden ser más eficientes en la solubilización de P debido a que forma complejos muy estables con muchos metales, que pueden precipitar como sólidos cristalinos o amorfos.

Otro resultado, que soportó el potencial de los tres aislamientos para ser utilizados en la producción de bioinoculantes, fue el recuento de colonias, ya que, a las 72 h de cultivo discontinuo en las pruebas preliminares en medio con RP, los valores fueron altos para *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. y *Kosakonia* sp. ($10,9 \pm 0,5$, $9,0 \pm 0,5$ y $8,3 \pm 0,9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$), si se compara con otras investigaciones, en las que se utilizó fosfato tricálcico o RP como fuentes de fósforo en los cuales el recuento de colonias no fue superior a $7,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ [23,81,106].

3.4.3. Diseño del medio de cultivo y condiciones de producción

La eficacia del microorganismo es lo más importante para la producción de bioinoculantes, es la esencia del producto y normalmente el aislamiento se realiza a partir del suelo del cultivo al cual va a ser aplicado [77,78]. En este estudio, el criterio de selección del medio de cultivo se basó en obtener recuentos altos de BPS en cortos períodos de producción, con solubilización del P a partir de RP y liberación de PS en el medio de cultivo del bioinoculante producido con el consorcio en donde el factor tiempo fue determinante para trabajar con tiempos de producción de 6 horas y favorecer la producción de biomasa y la liberación de P a partir de la RP del medio de cultivo.

Para la variable respuesta recuento de BPS se determinó que el modelo fue significativo ($p=0,0101$), con porcentaje de contribución de 83,4 % y efecto estándar negativo (-1,77) (Tabla

3,4). No obstante, el factor tiempo fue determinante para trabajar con tiempos de producción de 6 horas para favorecer la producción de biomasa y la liberación de P de RP en el medio de cultivo.

El consorcio y el cocultivo de BPS crecieron en el medio y las condiciones seleccionadas para el medio MT11B. Para que se favoreciera el crecimiento de las BPS en consorcio y cocultivo, las bacterias utilizaron la fuente de carbono en este caso glucosa por medio de la vía oxidativa para la producción de ácidos orgánicos, la fuente de nitrógeno (hidrolizado de levadura cervecera) como sustrato para la mineralización de P por mediación de las enzimas fosfatasa y la RP como sustrato para la solubilización de P por intervención de los ácidos orgánicos producidos. Lo que coincide con la literatura ya que las bacterias del género *Pseudomonas*, *Serratia* y *Kosakonia* pueden emplear diferentes fuentes de carbono, nitrógeno (orgánicas e inorgánicas) y fósforo (fosfato tricálcico, hidroxiapatita, fosfatos de hierro, aluminio y RP), [7,53,107].

Paredes & Espinosa., (2010), proponen que la concentración de P soluble puede incrementarse en función del tiempo, por la acidificación del medio, dada principalmente por la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular provenientes del metabolismo de compuestos de alto peso molecular como carbohidratos, péptidos y lípidos [108]. Lo anterior concuerda con los resultados de este estudio, ya que la glucosa residual en el medio del tratamiento 11 para consorcio en el diseño del medio de cultivo presentó uno de los menores valores de los 11 tratamientos ($1,2 \pm 0,0 \text{ g L}^{-1}$) (**Fig. 3.4**). Por lo tanto, demostrando que este carbohidrato, utilizado como fuente de carbono fue asimilado. Además, los ácidos orgánicos se liberaron como producto del metabolismo que disminuyeron del pH. Por lo tanto, con un pH inferior a $4,0 \pm 0,2$ se incrementó la solubilización. *Koch et al., (2012)* evaluaron el potencial para solubilizar fósforo de 10 especies de *Pseudomonas*, encontrando que la viabilidad de las bacterias puede disminuir notablemente cuando el medio alcanza pH muy ácidos [109]. Como se puede observar en la **Fig.3.5**, a las 10 h de cultivo el pH alcanzó uno de sus valores más bajos ($3,44 \pm 0,006$), lo que es perjudicial para la viabilidad de las bacterias, ya que la acidificación continuada del medio puede interpretarse como pérdida de viabilidad de la biomasa. Esta fue una de las variables que se tomó en cuenta para disminuir el tiempo de producción a 6 h, donde se obtuvo un pH de $3,57 \pm 0,010$ y el mayor conteo de biomasa de los puntos de tiempo evaluados en la curva de crecimiento del consorcio ($10,6 \pm 0,078 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$).

Se determinó la concentración de la fuente de C (glucosa) que en el medio de crecimiento MT11B es un factor importante para la producción extracelular de ácidos orgánicos por oxidación directa del sustrato. El hidrolizado de levadura cervecera como fuente orgánica de N, está directamente relacionada con la producción de enzimas fosfatasas que son cruciales en la mineralización del P. Y finalmente la RP como fuente inorgánica de P proporciona el sustrato para la liberación de P soluble por mediación de los ácidos orgánicos producidos en la vía oxidativa de la glucosa. Por lo anterior, es necesario contar con fuentes nutricionales adecuadas bajo determinadas concentraciones, para garantizar la formulación que genere una mayor producción de biomasa y que también genere los metabolitos necesarios para los fines requeridos [8,22,110].

La temperatura y agitación fueron factores que también tuvieron influencia en las condiciones de producción. La temperatura puede acelerar la velocidad de las reacciones metabólicas hasta que se alcanza el óptimo. La agitación permite que los componentes insolubles del medio como la FR este en suspensión para que las bacterias puedan acceder a ella y adicionalmente se genere la transferencia de oxígeno que favorece el crecimiento de las BPS aerobias [20].

3.4.4. Curvas de crecimiento y producción de biomasa

Para la producción de un bioinoculante formulado como cultivo completo que incluya las células viables y sus metabolitos (ácidos orgánicos, hidrogeniones, sustancias promotoras de crecimiento vegetal y fosfatasas), se deben considerar aspectos como la composición del medio de cultivo asociado con las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, costos de las materias primas y tiempos de proceso [4,8,24]. En este sentido surgió la necesidad de evaluar un medio alternativo al SMRS1, al Pikovskaya y al NBRIP (*National Botanical Research Institute's phosphate*), que fuera económico y que, en períodos de tiempo cortos, se pudieran obtener rendimientos y productividades iguales o superiores a los medios mencionados.

De acuerdo con los resultados, el consorcio y el cocultivo crecieron en los medios evaluados sin que se observara la fase de adaptación.

En 6 horas se obtuvieron los recuentos más altos para el consorcio con $10,6 \pm 0,08$ unidades logarítmicas en medio MT11B y rendimiento de biomasa en sustrato de $3 \times 10^{10} \pm 5 \times 10^9$ UFC $\text{mL}^{-1} \text{g}^{-1} \text{L}^{-1}$. Este último parámetro presentó diferencias significativas con respecto al valor observado a las 12 horas en el mismo medio ($p < 0,05$) (**Tabla 3.5**), lo que demuestra que la producción de biomasa se favorece a la hora 6 en comparación a la hora 12 de producción. En relación al rendimiento del P soluble en glucosa, este fue más alto a las 12 horas en comparación con el presentado a la hora 6. En el proceso de producción del bioinoculante el producto requerido es la biomasa, por lo que es deseable maximizar el rendimiento de bacterias en el medio y este puede mejorarse aumentando la tasa de crecimiento [54].

En cuanto a los rendimientos y productividades de los ácidos orgánicos presentaron relación con las concentraciones obtenidas en donde el ácido glucónico fue el que se produjo en mayor proporción con respecto a los demás (**Tabla 3.5 y 3.10**). Ludueña *et al.*, (2018) mencionan que la solubilización de fosfatos minerales bacterianos es un mecanismo ampliamente asociado con la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, principalmente ácidos glucónico [111]. Al igual que en esta investigación, varios autores coinciden en afirmar que la producción de ácido glucónico puede ser el principal mecanismo de solubilización de P por las BPS del suelo [16,29,41,44,112].

Adicional al mecanismo de solubilización de P por ácidos orgánicos, se presenta el mecanismo de mineralización de P por enzimas fosfatasas [53]. Los resultados de productividad para fosfatasa alcalina ($0,625 \pm 0,031 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) fue superior en comparación a la productividad de la fosfatasa ácida ($0,380 \pm 0,013 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), (**Tabla 3.5**). Lukashe *et al.*, (2019) y Parastesh *et al.*, (2019) coinciden en afirmar que la actividad fosfatasa, en especial la alcalina se suprime con la rápida acumulación de compuestos de P inorgánicos. Lo que por lo tanto podría explicar las bajas productividades observadas en este estudio [53,113].

En relación al cocultivo, la productividad de la biomasa en el bioinoculante fue similar a la del consorcio, destacándose este último porque requiere un tiempo de producción 2 horas inferior con respecto al cocultivo. La misma tendencia se obtuvo en la productividad de fosfatasa y P soluble y los rendimientos de P en glucosa en donde se destacó el consorcio (**Tabla 3.5 y 3.8**). Angulo *et al.*, (2012) reportaron recuentos de BPS de $11,8 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ a las 24 horas de cultivo, en un medio líquido cuya fuente de P era RP a una concentración de (10 g L^{-1}) [22]. Los

resultados del presente estudio son similares en cuanto al recuento de BPS en medio MT11B, pero con una disminución en el proceso de producción, de 18 horas a favor para el consorcio y 16 para el cocultivo. Por otro lado, los recuentos obtenidos en el medio MT11B superaron algunos resultados reportados en los medios tradicionales para el cultivo de BPS. Ludueña *et al.*, (2017) obtuvieron $9,08 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ a las 20 h de cultivo en medio NBRIP con fosfato tricálcico [106]. Una unidad logarítmica menos que en el medio MT11B con 14 y 12 horas más de cultivo. Chen *et al.*, (2006) cultivaron bacterias Gram negativas en medio mineral, suplementado con fosfato tricálcico $5,0 \text{ g L}^{-1}$ por 3 días y obtuvieron recuentos de *Serratia marcescens*, que oscilaron entre 8,7 y 9,3 unidades logarítmicas [23].

Para que se favoreciera el crecimiento de las bacterias BPS, estas debieron consumir las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, presentes en los dos medios; siendo consistente con la literatura ya que las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Serratia* pueden emplear diferentes fuentes de carbono, nitrógeno (orgánicas e inorgánicas) y fósforo (fosfato tricálcico, hidroxiapatita, fosfatos de hierro, aluminio y RP), [8,19,24]. Sin embargo, tienen mayor afinidad por las hexosas como la glucosa; la cual puede ser metabolizada por vía oxidativa y sus intermediarios ingresar a ciclo de Krebs y luego a la cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa para la obtención de energía [8,19,105]. Omar, (1998) reportó que la adición de RP favorece el incremento de la biomasa cuando se utiliza en concentraciones superiores a 0,5 g por cada 100 mL medio, demostrando que la fuente inorgánica de fósforo, no sólo es materia prima para la solubilización, sino que también es utilizada para la producción de componentes estructurales y precursores para la producción de energía [97].

A medida que se consumió la fuente de carbono, el pH de los medios disminuyó (MT11B y SMRS1). Se sabe que la solubilización de P inorgánico se debe a diferentes mecanismos, como la liberación de ácidos orgánicos, extrusión de protones por la asimilación de amonio y producción de ácido carbónico proveniente de la respiración microbiana [114]. Otro componente del medio MT11B que también pudo favorecer la disminución del pH fue el hidrolizado de levadura cervecera. Se considera que las fuentes orgánicas de nitrógeno pueden aportar de forma simultánea carbono y nitrógeno, lo que favorece la obtención de concentraciones elevadas de biomasa en períodos de tiempo cortos, a diferencia de las fuentes de nitrógeno inorgánica [12]. Adicionalmente, durante la mineralización del nitrógeno orgánico

se puede producir amonio y este favorece la excreción de protones (H^+) que contribuyen a la disminución del pH [8].

La solubilización de fosfatos a partir de fuentes inorgánicas varía de acuerdo con la fuente inicial; siendo el fosfato tricálcico, la hidroxiapatita, los fosfatos de hierro, los fosfatos de aluminio y la RP, los más utilizados para estudiar los mecanismos de solubilización [8,19]. En el presente estudio se utilizó RP extraída de las minas del municipio de Pesca en el Departamento de Boyacá Colombia. Al realizar la caracterización química se determinó que estaba compuesta por: carbono (9,0 %), oxígeno (53,24 %), aluminio (0,57 %), silicio (4,48 %), fósforo (11,18 %) y calcio (21,42 %). Oliveira *et al.*, (2014) mencionan que, durante la solubilización de P de RP, se libera una cantidad significativa de fluoruro (F^-) junto con P, que genera una fuerte disminución en el proceso, asociado con la disminución en la viabilidad de los microorganismos debido a la toxicidad del F^- . La ausencia de flúor (F^-) garantizó que el cocultivo no fuera inhibido por este elemento; ya que se ha reportado que su presencia en la RP disminuye la solubilización; lo que está directamente relacionado con la pérdida de viabilidad en bacterias y hongos fosfato solubilizadores [100].

Los resultados de la caracterización de la RP indicaron que, aunque esta tenga un contenido de 25 % de P_2O_5 , este no está disponible, porque está unido en mayor proporción al Calcio. Por esta razón, se requiere de bacterias que puedan crecer en presencia de esta forma inorgánica de P y además tengan la capacidad de producir los ácidos que participan en el proceso de solubilización para liberar P soluble en el medio. La liberación de PS a partir de la RP ocurrió bajo condiciones ácidas en el medio, debido a la utilización de la fuente de carbono y consecuente liberación de ácidos orgánicos en el medio, que generaron la disminución del pH. Por otro lado, la solubilización por ácidos orgánicos es un proceso que puede estar parcialmente asociado con el crecimiento ya que se observa la liberación de SP desde el inicio, pero continua en fase estacionaria e inclusive en la fase de muerte. Lo que podría relacionarse con la desaceleración del crecimiento ya que parte de las células que perdieron viabilidad pudieron haber liberado componentes intracelulares con características ácidas. Que no necesariamente son los ácidos orgánicos producidos por el metabolismo de la glucosa. Por esta razón, varios autores reportan que altas eficiencias de solubilización requieren tiempos de proceso más prolongados que para la producción de biomasa [14,43,115,116]. Paul *et al.*, (2018) sugieren que los valores máximos

de solubilización se pueden obtener entre 72 y 96 h [88]. Un resultado similar fue reportado por Sreenivasulu *et al.*, (2014) en su trabajo demostró que la cepa SVUNM17 aislada de minas en Moscú solubiliza la RP obteniendo $76,1 \text{ mg L}^{-1}$ a los 28 días de cultivo [117]. Concentraciones similares se obtuvieron en este trabajo en menos de 72 horas.

Por otro lado, el uso de cocultivos o consorcios garantiza mayor eficiencia en la solubilización porque al emplear más de una bacteria se pueden producir de forma simultánea diversos tipos de ácidos orgánicos, se activan otros mecanismos de solubilización y eventualmente las bacterias podrían producir sustancias que promueven el crecimiento vegetal. Lara-Mantilla *et al.*, (2015) y Nandimath *et al.*, (2017), demostraron que al emplear consorcios bacterianos en concentraciones de $10 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ se incrementa la solubilización de fósforo, comparado con las cepas por separado y en cocultivo [118,119].

En relación con el proceso de mineralización de P a partir de fuentes orgánicas, este ocurre por mediación de las enzimas fosfatasas extracelulares (E.C. 3.1.3) [120]. En este estudio, el medio MT11B tiene como fuente de nitrógeno y fósforo orgánico hidrolizado de levadura cervecera. Este subproducto se obtiene una vez realizado el proceso de fermentación del mosto de cebada durante la producción de la cerveza. La levadura se recupera, se deseca a altas temperaturas y se comercializa. Durante el tratamiento térmico la levadura se lisa y se liberan fosfolípidos de membrana que pueden actuar como sustratos orgánicos para las fosfatasas. Por otro lado, Parhamfar *et al.*, (2016) demostró que al evaluar el fitato sólo y en mezcla con fosfato tricálcico se favorece el crecimiento de los microorganismos y la producción de fosfatasas [12]. Un resultado similar al de Parhamfar *et al.*, (2016) se obtuvo en el presente estudio ya que el medio MT11B contiene una mezcla de fósforo orgánico e inorgánico [12]. La actividad fosfatasa en el consorcio fue de $2,3 \pm 0,08$ y $3,8 \pm 0,13$ para fosfatasa ácida y alcalina respectivamente, y $1,3 \pm 0,04$ UP en el cocultivo (ácida). Al cuantificar baja actividad fosfatasa en los bioinoculantes, se podría relacionar con la concentración de P orgánico presente en el medio, ya que este sólo tiene $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de hidrolizado de levadura; la cual no puede asociarse en su totalidad como fósforo orgánico. Probablemente al incrementar la concentración del hidrolizado de levadura podría aumentar la actividad enzimática [59,121,122].

3.4.5. Estabilidad de la biomasa a diferentes temperaturas y pH

La competitividad de las BPS en ambientes naturales dependerá de su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en el suelo y está influenciada por factores ambientales; como la composición del suelo, temperatura, pH, textura del suelo, humedad y disponibilidad de sustratos [123]. La estabilidad del bioinoculante depende de varios factores. Dos de los más importantes fueron la temperatura y el pH. Respecto al primero, la biomasa del bioinoculante presentó estabilidad superior al 80 % en temperaturas que oscilaron entre 8 y 30 ± 2 °C, aunque para la liberación de P soluble se destaca la temperatura de 30 ± 2 °C (Fig. 3.7a) en donde se obtuvo la mayor concentración con $51,6 \pm 1,068$ mg L⁻¹, por lo cual se seleccionó 30 °C como la temperatura más adecuada para mantener la estabilidad del bioinoculante en términos de biomasa y liberación de P soluble en el medio. Estos resultados se relacionan con los obtenidos por Suleman *et al.*, (2018), quienes también evaluaron el efecto de la temperatura y el pH en la solubilización de P por *Pseudomonas* sp., MS16 y *Enterobacter* sp., MS32 obteniendo resultados similares ($22,5$ °C y pH 7,0 \pm 0,2) [104]. Aliasgharzad *et al.*, (2009) reportaron 27/18 °C (día/noche) como temperaturas óptimas para el cultivo de *A. cepa* L. [124]. Álvarez-Hernández *et al.*, (2011) reportaron climas templados y fríos a 900 msnm, con temperaturas alrededor de los 25 °C [32]. Ikeda *et al.*, (2019) compararon diferentes temperaturas en el cultivo de *A. cepa* L. obteniendo los mejores resultados a 25 °C [125]. Los reportes mencionados anteriormente se relacionan con los resultados de estabilidad a temperatura obtenidos en este estudio ya que el porcentaje de viabilidad más alto se obtuvo a 30 ± 2 °C (100 %), lo que significa que el bioinoculante puede ser usado en campo en lugares con temperaturas cercanas a ésta.

A 40 y 50 °C disminuyó la viabilidad de las BPS (48 y 25 %); lo que pudo ocurrir posiblemente por las modificaciones de la membrana celular de las bacterias que incluye la desnaturalización de proteínas, la fusión de lípidos de membrana y la lisis de la pared, que genera la pérdida de viabilidad de las células y en consecuencia ya no capaces de crecer. Huguet *et al.*, (2019) explican el mecanismo de resistencia de las bacterias a altas temperaturas, por medio del alto contenido de lípidos saturados de cadenas largas, que forman enlaces hidrófobos muy estables al calor, otorgándoles a las bacterias adaptabilidad a altas temperaturas [126]. Lo anterior explica la pérdida de viabilidad de las BPS del consorcio a 40 y 50 °C de temperatura, ya que al ser mesófilas no cuentan con las características que les confieran resistencia a estas temperaturas.

Con respecto a la estabilidad de la biomasa a pH, el bioinoculante fue más sensible a los cambios en el mismo, ya que la biomasa disminuyó en todos los rangos evaluados (**Fig. 3.7c**). A las 12 horas de evaluación se presentó la menor pérdida de viabilidad de la biomasa a pH $6,0 \pm 0,2$, mostrando 68 % de estabilidad con un recuento de $7,2 \pm 0,009 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ respecto al 100 % inicial ($10,5 \pm 0,142 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$) (**Fig. 3.7**). Estos resultados se relacionan con los obtenidos por Patel *et al.*, (2016), quienes determinaron que la tolerancia de las bacterias a los cambios de pH es limitada y los cambios bruscos pueden producir pérdida en la viabilidad y la muerte ya que se afecta la membrana citoplasmática del microorganismo, el transporte de solutos, se da la inhibición de enzimas y desnaturalización de proteínas [127].

De Oliveira Mendes *et al.*, (2014) mencionan en su estudio, que el pH del medio de cultivo influye directamente en el crecimiento de los microorganismos y en los procesos bioquímicos que realizan. Lo anterior, sumado a que la acidificación es el principal mecanismo involucrado en la solubilización de P, soportan la importancia de estudiar el efecto del pH del medio en la capacidad de solubilización de P por parte de los microorganismos [100]. Marra *et al.*, (2015) estudiaron dicha capacidad en 82 cepas, encontrando que había una correlación entre el pH del medio y la cantidad de P solubilizado y lo atribuyeron a que las BPS presentan un rango óptimo de crecimiento entre pH de 5,0 y $7,0 \pm 0,2$ [128]; lo que se demostró en los resultados obtenidos a pH de 6,0 y $7,0 \pm 0,2$ en donde se obtuvo la mayor concentración de P soluble con $45,6 \pm 1,695$ y $47,6 \pm 2,237 \text{ mg L}^{-1}$. Jha *et al.*, (2013) estudiaron el efecto del pH y la temperatura en la solubilización de P, empleando 6 BPS de los géneros Burkholderia, Enterobacter, Serratia, Klebsiella, y Aeromonas, encontrando que la temperatura óptima de solubilización de P a partir de fosfato dicálcico, fosfato tricálcico y PR fue $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a pH $6,0 \pm 0,2$; resultados que concuerdan con los obtenidos en este estudio (**Fig. 3.7a**), [129].

El pH es un factor importante para la adsorción y formación de biopelículas de microorganismos a diferentes tipos de soportes, ya que puede incrementar o disminuir la cantidad de células que se adsorben. Zhao *et al.*, (2019) destacan que las células bacterianas generalmente presentan carga negativa neta en su pared celular a pH 7 y que la formación de biopelícula está influenciada por factores como las propiedades físicas de la superficie del soporte y factores ambientales como el pH y la temperatura la especie microbiana, la disponibilidad de nutrientes, la composición y rugosidad de la superficie del soporte, la motilidad celular, temperatura e hidrofobicidad

[130,131]. En este estudio se observó la formación de biopelículas de BPS del consorcio sobre la superficie de la FR presente en el medio MT11B (**Fig. 3.9**). Rabin *et al.*, (2015) reportan la formación de biopelícula por parte de *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, por medio de la producción de exopolisacáridos (EPS), que sirvieron para soportar estas bacterias a una superficie; aclarando que algunos exopolisacáridos no son específicos de biopelícula, pero su producción aumenta como resultado de una respuesta al estrés, como por ejemplo la producción de ácidos [132]. Bales *et al.*, (2013) mencionan que los exopolisacáridos pueden ser el constituyente principal asociado con el desarrollo de biopelículas [133].

3.4.6. Solubilización de P inorgánico

Las BPS solubilizan el P extraíble para liberar formas disponibles de P como HPO_4^{2-} y $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ a través de la excreción de H^+ , la biosíntesis de fosfatasas y la producción de ácidos orgánicos. Durante estos procesos, se produce la acidificación del medio, y el pH puede disminuir de $7,0 \pm 0,2$ hasta valores ácidos alrededor de $2,0 \pm 0,2$ [100,107,134]. La tasa de solubilización depende de la fuente de P y del microorganismo a evaluar [100]. Autores como Mardad *et al.*, (2013) y Suleman *et al.*, (2018), atribuyen esta acidificación al consumo de glucosa y a la producción de ácidos orgánicos [8,104]. Entre los ácidos más reportados se encuentran el ácido oxálico, el cítrico, el succínico, el láctico, y el glucónico [134]. El ácido glucónico es el ácido producido por las BPS y el más frecuentemente reportado; su síntesis es catalizada por la enzima glucosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.5.2.) unida a la membrana de las bacterias Gram negativas por la oxidación directa de glucosa [4,100,135–137]. La producción de ácido glucónico en el consorcio (**Tabla 3.10**), concuerda con lo reportado por varios autores [87,108,138]. Stella & Hamili, (2015) relacionaron la producción de ácido glucónico con la solubilización de fosfato mineral con BPS [19], lo que también se observó en este estudio, obteniéndose 862 mg L^{-1} de ácido glucónico en 6 horas de producción del bioinoculante (**Tabla 3.10**) con una concentración de P soluble de $45,8 \text{ mg L}^{-1}$ (**Fig. 3.5**) y productividad de PS de $6,9 \pm 1,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (**Tabla 3.5**).

3.4.7. Mineralización de P orgánico

En relación a la mineralización del fósforo orgánico, este proceso ocurre a partir de la síntesis de fosfatasas, catalizando la hidrólisis de los enlaces ésteres fosfóricos [139]. Para iniciar la mineralización de P orgánico, las BPS producen fosfatasas que hidrolizan los enlaces éster de las

formas de P orgánico (fosfolípidos de membrana) presentes en el en el hidrolizado de levadura, que actuaría como sustrato inductor. Por esta razón se observó un incremento en la actividad enzimática. [Angulo-Cortés et al., \(2012\)](#) reportan productividad de $0,072 \pm 0,07$ PU h⁻¹ para un cocultivo de BPS a las 24 horas de evaluación [22]. Al comparar los resultados de estos autores con los obtenidos en el presente estudio, se puede observar mayor actividad tanto para fosfatasa ácida como alcalina, usando la misma fuente de P orgánico como componente del medio de cultivo y en un período de tiempo 4 veces menor (6 h), lo que muestra mayor eficiencia en el proceso de producción del bioinoculante, empleando las BPS del consorcio (**Tabla 3.6**).

El interés en las enzimas fosfatasa ha aumentado en los últimos años, debido a sus posibles aplicaciones biotecnológicas, pues en este sentido, muchos microorganismos producen enzimas fosfatasa que pueden liberar fosfato inorgánico de los complejos orgánicos organofosforados, y que según el pH óptimo se clasifican como ácidas y alcalinas [20]. En el presente estudio, se realizaron filtraciones secuenciales del sobrenadante del bioinoculante, cuantificando la actividad de las fosfatasa ácida y alcalina en cada uno de los filtrados y concentrados, con la finalidad de determinar el rango aproximado de pesos moleculares de las fosfatasa presentes (**Fig. 3.8**). Los resultados mostraron que un poco menos de la mitad de actividad fosfatasa alcalina se perdió al filtrar por 100.000 Da, lo que sugiere que el peso molecular estaba por encima de 100.000 Da; el resto de la actividad fosfatasa alcalina fue concentrada después de filtrar por 10.000 Da, lo que sugiere que el peso molecular era aproximadamente igual o menor a 10.000 Da. La actividad fosfatasa ácida se concentró después de filtrar por 10.000 Da, lo que sugiere pesos moleculares aproximadamente iguales o inferiores a 10.000 Da.

Algunos autores como [Preobrazhenskaya et al., \(2003\)](#) han reportado fosfatasa de *Serratia* sp., con peso molecular de 29.000 Da [140]. Otros autores como [Liu et al., \(2016\)](#), [Pramanik et al., \(2017\)](#) y [Bheri & Pandey \(2018\)](#), reportaron pesos moleculares de fosfatasa de *Pseudomonas* spp., alrededor de 50.000 Da [120,141,142]; lo que coincide con los resultados de este estudio. [Liu et al., \(2016\)](#), reportaron fosfatasa alcalina citoplasmática, periplásmica y extracelular en *Pseudomonas*; encontrando pesos moleculares inferiores a 25.000 Da [141]. [Behera et al., \(2017\)](#) reportan fosfatasa alcalina parcialmente puras de *Alcaligenes faecalis* aisladas de suelo de manglar, tres bandas de aproximadamente 45.000, 25.000 y 17.000 Da [143]. Reportes y resultados que comprueban la variabilidad molecular de este grupo de enzimas. Las enzimas fosfatasa presentes

en el bioinoculante, constituyen un valor agregado en el producto ya que son un mecanismo adicional a la solubilización por ácidos orgánicos, que contribuye para el aumento de la disponibilidad de fósforo en la solución del suelo para las plantas.

Alori et al., (2017) mencionan en su investigación la teoría del sumidero, que soporta el proceso de solubilización de P orgánico, refiriéndose a la eliminación continua de P que se genera como resultado la disolución de elementos asociados al P. La descomposición de P en sustratos orgánicos se correlaciona constantemente con el contenido de P en la biomasa. Uno de los grupos de enzimas implicadas en este proceso son las fosfatasas, que tienen como mecanismo de acción la desfosforilación del enlace éster del P de compuestos orgánicos [144]. *Behera et al., (2017)* estudiaron la solubilización de P y la actividad fosfatasa ácida de *Serratia* sp., en esta investigación mencionan que la producción de fosfatasa está estrechamente relacionada e influenciada por parámetros de crecimiento tales como pH, temperatura, velocidad de agitación, fuente de carbono y fuente de nitrógeno [20]. Por esta razón, para optimizar la producción de fosfatasas por parte del consorcio, sería necesario evaluar la condición óptima de los parámetros mencionados anteriormente, a través de un diseño experimental.

El pH es un factor importante para la adsorción y formación de biopelículas en diferentes tipos de soportes, ya que puede aumentar o disminuir el número de células adsorbidas. *Zhao et al., (2019)* destacó que a pH 7, por lo general las bacterias presentan una carga neta negativa en su pared celular, por lo que las propiedades físicas de la superficie del soporte, incluida la composición y rugosidad, influyen en la formación de biopelículas. Además, los factores ambientales como el pH y la temperatura también juegan un papel. Por último, también influyen las especies microbianas, la disponibilidad de nutrientes, la movilidad celular, la temperatura y la hidrofobicidad [145]. Las biopelículas son la asociación de microorganismos que se acumulan en las interfaces y se encapsulan dentro de una matriz viscosa polimérica extracelular conocida como exopolisacárido (EPS) [146]. *Nazir et al., (2019)* afirman que las biopelículas se forman para proteger las bacterias de condiciones ambientales adversas y deficiencia de nutrientes y están compuestas principalmente por células microbianas y EPS (enzimas, DNA, RNA, polisacáridos y agua) [146]. *Mezzatesta et al., (2012)* encontraron que la formación de biopelículas y la colonización de superficies inertes en Enterobacteriaceae se deben a una clase de fibras extracelulares proteicas, que median la unión a una variedad de proteínas de las bacterias [62].

En el presente estudio, se observó la formación de biopelículas de BPS de la superficie de RP presente en los medios MT11B (**Fig. 3.9**). Rabin *et al.*, (2015) reportaron la formación de biopelículas por *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias de la familia Enterobacteriaceae, mediante la producción de exopolisacáridos (EPS) que sirvieron para apoyar a las bacterias en la superficie. Señalaron que ciertos EPS no son específicos de biopelículas, pero su producción aumenta como resultado de la respuesta al estrés, como la producción de ácido [132]. Bales *et al.*, (2013) también describieron que los EPS pueden ser un componente principal asociado con el desarrollo de biopelículas [133]. La formación de biopelículas en cualquier sustrato se inicia con la adhesión de la bacteria a la superficie, seguido por la adhesión bacteria-bacteria en donde estas se adhieren entre sí y forman microcolonias estables, para posteriormente darse la proliferación y crecimiento de la biopelícula como resultado de la señalización química de las microcolonias que comienzan a multiplicarse. Este proceso también depende de la rugosidad e hidrofobicidad de la superficie. Más la disponibilidad de nutrientes y el contenido de humedad [146].

Si bien la solubilización de P toma más tiempo que la producción de biomasa, al desarrollar un bioinoculante para uso en semilleros y campo, es más favorable tener un producto con elevadas concentraciones de biomasa viable así la concentración de P soluble en el producto no sea tan alta. Básicamente porque que a mayor concentración de células es factible que éstas sigan teniendo la actividad solubilizadora en suelo y rápidamente colonicen la zona rizosferica a tgraves de la formación de biopelículas. Mientras que el fósforo extraíble puede ser precipitado por cationes presentes en el suelo y no queda disponible para las plantas cuando se aplica el producto [29,147,148].

La RP de esta investigación es un material que presenta superficie irregular, rugosa, porosa, con granulometría de diferentes tamaños, que al interactuar con los EPS secretados por las bacterias del bioinoculante se dan las condiciones para la formación de biopelículas. Adicionalmente el medio de cultivo MT11B proporciona los nutrientes y humedad para que bajo las condiciones evaluadas se facilite el proceso de formación de biopelículas bacterianas en la superficie de la RP.

3.5. Conclusiones

El diseño Plakett Burman permitió seleccionar las condiciones de producción y los componentes del medio de cultivo que favoreció la producción de biomasa ($>1 \times 10^7$ UFC mL⁻¹) y solubilización de P a partir de RP en cultivo discontinuo en 6 h (consorcio) y 8 h (cocultivo). Adicionalmente, los componentes del medio diseñado se destacan por ser de fácil adquisición y bajo costo, lo que genera reducción considerable en el costo de producción.

Con la producción del bioinoculante compuesto por las tres BPS (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.) aisladas de suelos del departamento de Boyacá en los municipios de Pesca y Punta Larga en donde se cultiva cebolla cabezona (*A. cepa* L.) y es utilizada la RP, se favorecieron las condiciones para la solubilización de P de PR como fuente de P altamente insoluble. Las BPS seleccionadas para este estudio, además, tuvieron la capacidad de crecer en presencia de hidrolizado de levadura cervecera como fuente de P orgánico para la liberación de enzimas fosfatasa.

3.6. Productos científicos derivados del objetivo específico 1

3.6.1. Artículos científicos

Consortio: Blanco-Vargas A, Rodriguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, Diaz-Ariza LA, Gutiérrez-Romero EV, Rivera-Hoyos CM, Ardila-Leal LD, Pedroza-Rodríguez AM. Effect of bioinoculant (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., and *Kosakonia* sp.) on *Allium cepa* L. at plot scale. *Universitas Scientiarum*. 2020. **En prensa**

Cocultivo: Blanco-Vargas A, Rodriguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Garzon-Jaramillo R, Pedroza-Camacho LD, Poutou-Piñales RA, Rivera-Hoyos CM, Díaz-Ariza LA, Pedroza-Rodríguez AM. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*. 2020;6. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05218.



3.6.2. Formación de talento humano: Trabajos de Grado de pregrado codirigidos, asociados al objetivo específico 1

- Rodríguez Gacha LM, Sanchez Castro N. Selección y producción de bacterias solubilizadoras de fósforo empleando roca fosforica como sustrato. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 2018.
- Herrera Carlosama L. Evaluación de un biofertilizante a base de bacterias fosfato solubilizadoras en presentacion líquida y sólida sobre el crecimiento de *Allium cepa* L. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 2019 **-Mencion de honor-**



3.6.3. Participación en eventos científicos

- Participación en modalidad de poster en el Bogotá Microbial Meeting 2017, que se llevó a cabo en la Universidad de Los Andes (Colombia) los días 18 y 19 de agosto de 2017.



- Participación en modalidad de poster en el III Encuentro de Investigación organizado por la Dirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana (Colombia), que se llevó a cabo el 01 de junio de 2018.



- Participación en modalidad de poster en el Bogotá Microbial Meeting 2018, que se llevó a cabo en la Universidad El Bosque (Colombia) los días 9 y 10 de agosto de 2018.



3.7. Referencias

1. Vieira da Silva FB, Araújo do Nascimento CW, Muniz Araújo PR. Environmental risk of trace elements in P-containing fertilizers marketed in Brazil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2017;17: 635–647.
2. Yu X, Liu X, Zhu TH, Liu GH, Mao C. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *European Journal of Soil Biology*. 2012;50: 112–117. doi:10.1016/j.ejsobi.2012.01.004
3. Silva FBV, Nascimento CWA, Alvarez AM, Araújo PRM. Inputs of rare earth elements in Brazilian agricultural soils via P-containing fertilizers and soil correctives. *Journal of Environmental Management*. 2019;232: 90–96. doi:10.1016/j.jenvman.2018.11.031
4. Yadav H, Fatima R, Sharma A, Mathur S. Enhancement of applicability of rock phosphate in alkaline soils by organic compost. *Applied Soil Ecology*. 2017;113: 80–85. doi:10.1016/j.apsoil.2017.02.004
5. De Oliveira Mendes G, Mansur Murta H, Vasconcelos Valadares R, Batista da Silveira W, Ribeiro de Silva I, Dutra Costa M. Oxalic acid is more efficient than sulfuric acid for rock phosphate solubilization. *Minerals Engineering*. 2020;155: 106458. doi:10.1016/j.mineng.2020.106458
6. Agencia Nacional de Minería. Roca fosfórica. 2015; 2.
7. De Oliveira Mendes G, Galvez A, Vassileva M, Vassilev N. Fermentation liquid containing microbially solubilized P significantly improved plant growth and P uptake in both soil and soilless experiments. *Applied Soil Ecology*. 2017;117–118: 208–211. doi:10.1016/j.apsoil.2017.05.008
8. Mardad I, Serrano A, Soukri A. Effect of Carbon, Nitrogen Sources and Abiotic Stress on Phosphate Solubilization by Bacterial Strains Isolated from a Moroccan Rock Phosphate Deposit. *Journal of Advanced J Chemical Engineering*. 2014;4: 1–10. doi:10.4172/2090-4568.1000102
9. Manzoor M, Abbasi MK, Sultan T. Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria from Maize Rhizosphere and Their Potential for Rock Phosphate Solubilization-Mineralization and Plant Growth Promotion. *Geomicrobiology Journal*. 2017;34: 81–95. doi:10.1080/01490451.2016.1146373
10. Yoldas F, Ceylan S, Mordogan N, Esetlili BC. Effect of organic and inorganic fertilizers on yield and mineral content of onion (*Allium cepa* L.). *African Journal of Biotechnology*. 2011;10: 11488–11492. doi:10.5897/AJB10.2535
11. Shedeed SI, El-Sayed SAA, Bash DMA. Effectiveness of bio-fertilizers with organic matter on the growth, yield and nutrient content of Onion (*Allium cepa* L.) plants. *European International Journal of Science and Technology*. 2014;3: 115–122.

12. Parhamfar M, Badoei-Dalfard A, Parhamfar M, Fahimi Rad S. Purification and Characterization of an Extracellular Phosphatase Enzyme From *Bacillus* spp. *Journal of Cell and Molecular Research*. 2016;8: 90–97. doi:10.22067/jcmr.v8i2.58676
13. Jones DL. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil* 205: 1998;205: 25–44.
14. Wei Y, Zhao Y, Shi M, Cao Z, Lu Q, Yang T, et al. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*. 2018;247: 190–199. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.092
15. Jones D, Oburger E. Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. *Phosphorus in Action*. 2011. pp. 169–198. doi:10.1007/978-3-642-15271-9
16. Thakur D, Kaushal R, Shyam V. Phosphate solubilising microorganisms: role in phosphorus nutrition of crop plants-A review. *Agricultural Reviews*. 2014;35: 159–171. doi:10.5958/0976-0741.2014.00903.9
17. Valetti L, Iriarte L, Fabra A. Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus*) associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria. *Applied Soil Ecology*. 2018;132: 1–10. doi:10.1016/j.apsoil.2018.08.017
18. Jog R, Pandya M, Nareshkumar G, Rajkumar S. Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology*. 2014;160: 778–788. doi:10.1099/mic.0.074146-0
19. Stella M, Halimi M. Gluconic acid production by bacteria to liberate phosphorus from insoluble phosphate complexes. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*. 2015;43: 41–53.
20. Behera BC, Yadav H, Singh SK, Mishra RR, Sethi BK, Dutta SK, et al. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15: 169–178. doi:10.1016/j.jgeb.2017.01.003
21. Zhu J, Li M, Whelan M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of the Total Environment*. 2018;612: 522–537. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.095
22. Angulo Cortes JP, Garcia Diaz A, Pedroza AM, Martinez Salgado MM, Gutierrez Romero V. Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. *Universitas Scientiarum*. 2012;17: 43–52.
23. Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. 2006;34: 33–41. doi:10.1016/j.apsoil.2005.12.002

24. Hameeda B, Reddy YHK, Rupela OP, Kumar GN, Reddy G. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna. *Current Microbiology*. 2006;53: 298–302. doi:10.1007/s00284-006-0004-y
25. Swetha S, Padmavathi T. Study of Acid Phosphatase in Solubilization of Inorganic Phosphates by *Piriformospora indica*. *Polish Journal of Microbiology*. 2016;65: 407–412.
26. Wu J, Zhang A, Li G, Wei Y, He S, Lin Z, et al. Effect of different components of single superphosphate on organic matter degradation and maturity during pig manure composting. *Science of the Total Environment*. 2019;646: 587–594. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.336
27. Igual JM, Valverde A, Cervantes E, Velázquez E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*. 2001;21: 561–568. doi:10.1051/agro:2001145
28. Karlicic V, Radic D, Jovicic-Petrovic J, Lalevic B, Jovanovic L, Kikovic D, et al. Isolation and characterization of bacteria and yeasts from contaminated soil. *Journal of Agricultural Sciences*. 2016;61: 247–256. doi:10.2298/jas1603247k
29. Krishnaraj PU, Dahale S. Mineral phosphate solubilization: Concepts and prospects in sustainable agriculture. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 2014;80: 389–405. doi:10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55116
30. Vassilev N, Mendes G, Costa M, Vassileva M. Biotechnological Tools for Enhancing Microbial Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphates. *Geomicrobiology Journal*. 2014;31: 751–763. doi:10.1080/01490451.2013.822615
31. Boyhan GE, Torrance RL, Hill CR. Effects of Nitrogen, Phosphorus, and Potassium Rates and Fertilizer Sources on Yield and Leaf Nutrient Status of Short-day Onions. *Hort Science*. 2007;42: 653–660.
32. Álvarez Hernández JC, Venegas Flores S, Soto Ayala C, Chávez Vargas A, Zavala Sánchez L. Uso de fertilizantes químicos y orgánicos en cebolla (*Allium cepa* L.) en Apatzingán, Michoacán, México. *Avances de investigación agropecuaria*. 2011;15: 29–43.
33. Blanco C, Lagos J. Manual de producción de cebolla. Santiago, Chile; 2017. doi:0717-4829
34. Vaccari DA. Phosphorus: A Looming. *Scientific American*. 2009; 54–59.
35. Patiño Torres C, Sánchez De Prager M. Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizosfera de chontaduro (*B. gassipaes kuntii*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2012;10: 177–187.
36. Acevedo E, Galindo-Castañeda T, Prada F, Navia M, Romero M. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology*. 2014;80: 26–33. doi:10.1016/j.apsoil.2014.03.011

37. Rodríguez Gacha LM, Sánchez Castro N. Selección y producción de bacterias solubilizadoras de fósforo empleando roca fosfórica como sustrato. Pontificia Universidad Javeriana. 2018.
38. Zapata Hernández RD. Medida de la acidez en los suelos. Química de la acidez del suelo. Medellín, Colombia; 2002. pp. 113–137.
39. Porras A. Método Kriging de inferencia espacial. *Repositorio Nacional CONACYT*. 2017.
40. Paul NB, Sundara Rao WVB. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. *Plant and Soil*. 1971;35: 127–132. doi:10.1007/BF01372637
41. Blanco-Vargas A, Rodríguez-Gacha LM, Sánchez-Castro N, Garzón-Jaramillo R, Rivera-Hoyos CM, Díaz-Ariza LA, et al. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*. 2020a;6: e05218. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05218
42. Collins C, Lyne P. Microbiological Methods. Eighth Ed. 2004; 456.
43. Pande A, Pandey P, Mehra S, Singh M, Kaushik S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017. doi:10.1016/j.jgeb.2017.06.005
44. Blanco-Vargas A, Rodríguez-Gacha LM, Sánchez-Castro N, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, Díaz-Ariza LA, et al. Effect of bioinoculant (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., and *Kosakonia* sp.) on *Allium cepa* L. at plot scale. *Universitas Scientiarum*. 2020b. doi:In review
45. Murphy J, Riley JP. A single-solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1958.
46. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31: 426–428. doi:10.1021/ac60147a030
47. Poutou Piñales R, Amador Martínez E, Candelario Frontela M. Banco de células primario (BCP): caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Biología aplicada*. 1994;11: 55–59.
48. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic acids research*. 2016;44: 6614–24. doi:10.1093/nar/gkw569
49. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics Applications Note*; 2007. pp. 2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
50. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of Protein Molecules. *Mammalian Protein Metabolism: Volume III*. New York, USA; 1969. p. 66. doi:10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7

51. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*. 2018;35: 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
52. Ahmad E, Khan MS, Zaidi A. ACC deaminase producing *Pseudomonas putida* strain PSE3 and *Rhizobium leguminosarum* strain RP2 in synergism improves growth, nodulation and yield of pea grown in alluvial soils. *Symbiosis*. 2013;61: 93–104. doi:10.1007/s13199-013-0259-6
53. Parastesh F, Alikhani A, Etesami H. Vermicompost enriched with phosphate solubilizing bacteria provides plant with enough phosphorus in a sequential cropping under calcareous soil conditions. *Journal of Cleaner Production*. 2019;221: 27–37. doi:10.1016/j.jclepro.2019.02.234
54. Doran PM. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press; 1995.
55. HACH. Manual de analisis de agua: Procedimientos Fotometricos, de titulacion y microbiologicos de HACH Company. *Cell*. 2000.
56. Morris T, Rojas S, Diaz L, Pedroza A. Evaluation of Cellulolytic and Hemicellulolytic Activity of a Bacterial Consortium Inoculated in Bark of *Pinus caribaea*. Third International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies. Battelle; 2015.
57. Tabatabai MA, Bremner JM. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 1969;1: 301–307. doi:10.1016/0038-0717(69)90012-1
58. Rodriguez Y, Cardenas A, Camelo C. Protocolo para la determinacion de la actividad fosfatasa ácida y alcalina en suelos - Laboratorio de Microbiología agrícola - Universidad Nacional de Colombia. Bogota; 2009. p. 5.
59. Cisneros R C, Sanchez de P M, Menjivar F J C. Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos en un Andisol de la región cafetera colombiana. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2017;19: 21–28. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.65966
60. Chakdar H, Dastager SG, Khire JM, Rane D, Dharne MS. Characterization of mineral phosphate solubilizing and plant growth promoting bacteria from termite soil of arid region. *3 Biotech*. 2018;8: 1–11. doi:10.1007/s13205-018-1488-4
61. Leal Duarte J. Solubilizacao de fosfatos por *Aspergillus niger*, *Penicillium islandicum* e ácidos organicos. Universidade Federal de Viçosa. 2016.
62. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*. 2012;7: 887–902.
63. Silva F, Pabla Martinez T. Complejo Enterobacter cloacae. *Revista Chilena de Infectología*. 2018;35: 297–298. doi:http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000300297

64. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana NTC 5842 de 2018: Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Bogotá, Colombia; 2018.
65. Ortega B R. Agricultura de Precisión. Usos y Potencialidades en Chile. *Agronomía y Forestal*. : 15–21.
66. Jaramillo D. Variabilidad Espacial Del Suelo: Bases Para Su Estudio. *Revista de la Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín*. 2012;1: 73–87.
67. Fernandez O, Perez R, Gubinelli A, Matheus J. Influencia de la variabilidad espacial del suelo sobre parámetros de la Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum*) en Monay, Estado Trujillo. *Agricultura Andina*. 2007;13: 39–52.
68. Cristobal Acevedo D, Álvarez Sánchez M, Hernández Acosta E, Maldonado Torres R, Pérez Grajales M, Castro Brindis R. Spatial Variability of Chemical Properties of the Soil and its Use in the Design of Experiments. *Terra Latinoamericana*. 2008;26: 317–324.
69. Piotrowska-Długosz A, Breza-Boruta B, Długosz J. Spatial and temporal variability of the soil microbiological properties in two soils with a different pedogenesis cropped to winter rape (*Brassica napus* L.). *Geoderma*. 2019;340: 313–324. doi:10.1016/j.geoderma.2019.01.020
70. Lan G, Li Y, Lesueur D, Wu Z, Xie G. Seasonal changes impact soil bacterial communities in a rubber plantation on Hainan Island, China. *Science of the Total Environment*. 2018;626: 826–834. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.01.147
71. Zhang J, Feng L, Ouyang Y, Hu R, Xu H, Wang J. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in relation to phosphorus availability under different land uses for some latosols from Guangdong, China. *Catena*. 2020;195. doi:10.1016/j.catena.2020.104686
72. Khan KS, Joergensen RG. Changes in microbial biomass and P fractions in biogenic household waste compost amended with inorganic P fertilizers. *Bioresource Technology*. 2009;100: 303–309. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.002
73. Estrada-Bonilla GA, Durrer A, Cardoso EJB. Use of compost and phosphate-solubilizing bacteria affect sugarcane mineral nutrition, phosphorus availability, and the soil bacterial community. *Applied Soil Ecology*. 2021;157. doi:10.1016/j.apsoil.2020.103760
74. Lobo CB, Juárez Tomás MS, Viruel E, Ferrero MA, Lucca ME. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*. 2019;219: 12–25. doi:10.1016/j.micres.2018.10.012
75. Grageda-Cabrera OA, Díaz-Franco A, Peña-Cabriaes JJ, Vera-Núñez JA. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2012;3: 1261–1274.
76. Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*. 2013;2: 587. doi:10.1186/2193-1801-2-587

77. Zambrano-Moreno DC, Ramón-Rodríguez LF, Strahlen-Pérez M Van, Bonilla-Buitrago RR. Bioinoculants industry for agricultural use in Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 2015;18: 59–67.
78. Zambrano DC, Bonilla RR, Avellaneda L, Zambrano G. Análisis prospectivo de los bioinsumos agrícolas en Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2015;XVII: 103–113. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.48472
79. Álvarez-López C, Osorio-Vega W, Díez-Gómez MC, Marín-Montoya M. Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana*. 2014;25: 225–241. doi:10.15517/am.v25i2.15426
80. Fox A, Kwapinski W, Griffiths BS, Schmalenberger A. The role of sulfur- and phosphorus-mobilizing bacteria in biochar-induced growth promotion of *Lolium perenne*. *FEMS Microbiology Ecology*. 2014;90: 78–91. doi:10.1111/1574-6941.12374
81. Babu AG, Shea PJ, Sudhakar D, Jung IB, Oh BT. Potential use of *Pseudomonas koreensis* AGB-1 in association with *Miscanthus sinensis* to remediate heavy metal (loid)-contaminated mining site soil. *Journal of Environmental Management*. 2015;151: 160–166. doi:10.1016/j.jenvman.2014.12.045
82. Kaur G, Reddy MS. Effects of Phosphate-Solubilizing Bacteria, Rock Phosphate and Chemical Fertilizers on Maize-Wheat Cropping. *Pedosphere: An International Journal*. 2015;25: 428–437. doi:10.1016/S1002-0160(15)30010-2
83. Gusain YS, Kamal R, Mehta CM, Singh US, Sharma AK. Phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid producing bacteria from the soil of Garhwal Himalaya aimed to improve the growth of rice. *Journal of Environmental Biology*. 2015;36: 301–307.
84. Gao H, Lu C, Wang H, Wang L, Yang Y, Jiang T, et al. Production exopolysaccharide from *Kosakonia cowanii* LT-1 through solid-state fermentation and its application as a plant growth promoter. *International Journal of Biological Macromolecules* 150. 2020;150: 955–964. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.209
85. Aarab S, Ollero J, Megías M, Laglaoui A, Bakkali M, Arakrak A. Some characteristics of phosphate solubilizing rhizobacteria as an ecological strategy for sustainable agriculture. *Materials Today: Proceedings*. 2019;13: 1224–1228. doi:10.1016/j.matpr.2019.04.091
86. Beltran Pineda ME. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 2014;15: 101–113.
87. Oteino N, Lally RD, Kiwanuka S, Lloyd A, Ryan D, Germaine KJ, et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6: 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.00745
88. Paul R, Singh RD, Patra AK, Biswas DR, Bhattacharyya R, Arunkumar K. Phosphorus dynamics and solubilizing microorganisms in acid soils under different land uses of Lesser

- Himalayas of India. *Agroforestry Systems*. 2018;92: 449–461. doi:10.1007/s10457-017-0168-4
89. Kämpfer P, McInroy JA, Doijad S, Chakraborty T, Glaeser SP. *Kosakonia pseudosacchari* sp. nov., an endophyte of *Zea mays*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2016;39: 1–7. doi:10.1016/j.syapm.2015.09.004
 90. Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., . *Systematic and Applied Microbiology*. 2013;36: 309–319. doi:10.1016/j.syapm.2013.03.005
 91. Berger B, Patz S, Ruppel S, Dietel K, Faetke S, Junge H, et al. Successful Formulation and Application of Plant Growth-Promoting *Kosakonia radicincitans* in Maize Cultivation. *BioMed Research International*. 2018;2018: 1–8. doi:10.1155/2018/6439481
 92. Cruz Barrera M, Jakobs-Schoenwandt D, Gómez MI, Becker M, Patel A V, Ruppel S. Salt stress and hydroxyectoine enhance phosphate solubilisation and plant colonisation capacity of *Kosakonia radicincitans*. *Journal of Advanced Research*. 2019. doi:10.1016/j.jare.2019.03.012
 93. Becerra JM, Quintero D, Martínez M, Matiz A. Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Horticolas*. 2011;5: 195–208.
 94. Ahmad M, Lee SS, Rajapaksha AU, Vithanage M, Zhang M, Cho JS, et al. Trichloroethylene adsorption by pine needle biochars produced at various pyrolysis temperatures. *Bioresource Technology*. 2013;143: 615–622. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.033
 95. Zendejas G, Avalos H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad y metodos de identificacion. *Revista Biomed*. 2014;25: 129–143.
 96. Savardi M, Ferrari A, Signoroni A. Automatic hemolysis identification on aligned dual-lighting images of cultured blood agar plates. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2018;156: 13–24. doi:10.1016/j.cmpb.2017.12.017
 97. Omar SA. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 1998;14: 211–218.
 98. Gupta P, Kumar V. Value added phytoremediation of metal stressed soils using phosphate solubilizing microbial consortium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017;33. doi:10.1007/s11274-016-2176-3
 99. Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alam S, Latif F. Organic Acids Production and Phosphate Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) Under in vitro

Conditions. *National Agriculture Research Center*. 2004;7: 187–196. doi:1028-8880

100. De Oliveira Mendes G, Lopez Zafra D, Bojkov Vassilev N, Ribeiro Silva I, Ribeiro JI, Dutra Costa M. Biochar enhances aspergillus niger rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluoride toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014;80: 3081–3085. doi:10.1128/AEM.00241-14
101. Liu Z, Li YC, Zhang S, Fu Y, Fan X, Patel JS, et al. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology*. 2015;96: 217–224. doi:10.1016/j.apsoil.2015.08.003
102. Kamou NN, Dubey M, Tzelepis G, Menexes G, Papadakis EN, Karlsson M, et al. Investigating the compatibility of the biocontrol agent *Clonostachys rosea* IK726 with prodigiosin-producing *Serratia rubidaea* S55 and phenazine-producing *Pseudomonas chlororaphis* ToZa7. *Archives of Microbiology*. 2016. doi:10.1007/s00203-016-1198-4
103. Alam S, Khalil S, Ayub N, Rashid M. In vitro solubilization of inorganic phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2002;4: 454–458. doi:1560–8530/2002/04–4–454–458
104. Suleman M, Yasmin SI, Rasul M, Yahya M, Manzoor Atta B, Sajjad Mirza M. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *Plos One*. 2018;13. doi:10.1371/journal.pone.0204408
105. An R, Moe LA. Regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016;82: 4955–4964. doi:10.1128/AEM.00813-16
106. Ludueña LM, Anzuay MS, Magallanes-Noguera C, Tonelli ML, Ibañez FJ, Angelini JG, et al. Effects of P limitation and molecules from peanut root exudates on pqqE gene expression and pqq promoter activity in the phosphate-solubilizing strain *Serratia* sp. S119. *Research in Microbiology*. 2017; 1–12. doi:10.1016/j.resmic.2017.07.001
107. Bakhshandeh E, Rahimian H, Pirdashti H, Nematzadeh GA. Evaluation of phosphate-solubilizing bacteria on the growth and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in northern Iran. *Journal of Applied Microbiology*. 2015;119: 1371–1382. doi:10.1111/jam.12938
108. Paredes-Mendoza M, Espinosa-Victoria D. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: Una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*. 2010;28: 61–70.
109. Koch S, Majewski E, Schmeisky H, Schmidt FRJ. Critical Evaluation of Phosphate Solubilizing Pseudomonads Isolated from a Partially Recultivated Potash Tailings Pile. *Current Microbiology*. 2012;65: 202–206. doi:10.1007/s00284-012-0145-0
110. Chen X, Jiang N, Condrón LM, Dunfield KE, Chen Z, Wang J, et al. Soil alkaline phosphatase activity and bacterial phoD gene abundance and diversity under long-term nitrogen and manure inputs. *Geoderma*. 2019;349: 36–44.

doi:10.1016/j.geoderma.2019.04.039

111. Ludueña LM, Anzuay MS, Angelini JG, McIntosh M, Becker A, Rupp O, et al. Strain *Serratia* sp. S119: A potential biofertilizer for peanut and maize and a model bacterium to study phosphate solubilization mechanisms. *Applied Soil Ecology*. 2018;126: 107–112. doi:10.1016/j.apsoil.2017.12.024
112. Rafi MM, Krishnaveni MS, Charyulu PBBN. Phosphate-Solubilizing Microorganisms and Their Emerging Role in Sustainable Agriculture. *Soil and agriculture microbiology*. 2019. pp. 223–232. doi:10.1016/B978-0-12-816328-3.00017-9
113. Lukashe NS, Mupambwa HA, Green E, Mkeni PNS. Inoculation of fly ash amended vermicompost with phosphate solubilizing bacteria (*Pseudomonas fluorescens*) and its influence on vermi-degradation, nutrient release and biological activity. *Waste Management*. 2019;83: 14–22. doi:10.1016/j.wasman.2018.10.038
114. Della Mónica IF, Godoy MS, Godeas AM, Scervino JM. Fungal extracellular phosphatases: their role in P cycling under different pH and P sources availability. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;124: 155–165. doi:10.1111/jam.13620
115. Serna Posso EJ, Sánchez De Prager M, Cisneros Rojas CA. Organic acids production by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. *Acta Agronomica*. 2017;66: 241–247. doi:10.15446/acag.v66n2.56148
116. Mardad I, Serrano A, Soukri A. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research*. 2013;7: 626–635. doi:10.5897/AJMR12.1431
117. Sreenivasulu B, Chalapathi K, Paramageetham C, Babu GP. In Vitro phosphate solubilization abilities of three indigenous bacteria isolated from Muscovite mine. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014;3: 135–143.
118. Lara Mantilla C, Negrete Peñata JL. Effect of bio-inoculant from microbial consortia phosphate solubilizing natives in development of pastures (*Dichanthium aristatum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2015;17: 122–130. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50741
119. Nandimath AP, Karad DD, Gupta SG, Kharat AS. Consortium inoculum of five thermo-tolerant phosphate solubilizing Actinomycetes for multipurpose biofertilizer preparation. *Iranian Journal of Microbiology*. 2017;9: 295–304.
120. Pramanik K, Ghosh PK, Ray S, Sarkar A, Mitra S, Maiti TK. An in silico structural, functional and phylogenetic analysis with three dimensional protein modeling of alkaline phosphatase enzyme of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15. doi:10.1016/j.jgeb.2017.05.003
121. Instituto Geografico Agustin Codazzi I. Estudio General de Suelos y Zonificación de Tierras del Departamento de Boyaca. Tomo II. Bogota, Colombia; 2005.

122. Ruiz CF, Henao Gómez D, Lozano Borda M, Colorado LA, Mora Holguin H, Velandia Sanchez J, et al. Plan estratégico departamental de Ciencia, Tecnología e Innovación - PEDCTI Boyaca. Primera ed. Tunja; 2012.
123. Khan MS, Zaidi A, Wani PA. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2007;27: 29–43. doi:10.1051/agro:2006011
124. Aliasghar zad N, Ali Bolandnazar S, Neyshabouri MR, Chaparzadeh N. Impact of soil sterilization and irrigation intervals on P and K acquisition by mycorrhizal onion (*Allium cepa*). *Versita*. 2009;64: 512–515. doi:10.2478/s11756-009-0072-0
125. Ikeda H, Kinoshita T, Yamamoto T, Yamasaki A. Sowing time and temperature influence bulb development in spring-sown onion (*Allium cepa* L.). *Scientia Horticulturae*. 2019;244: 242–248. doi:10.1016/j.scienta.2018.09.050
126. Huguet A, Coffinet S, Roussel A, Gayraud F, Anquetil C, Bergonzini L, et al. Evaluation of 3-hydroxy fatty acids as a pH and temperature proxy in soils from temperate and tropical altitudinal gradients. *Organic Geochemistry*. 2019;129: 1–13. doi:10.1016/j.orggeochem.2019.01.002
127. Patel K, Patel S, Parekh V, Jha S. Isolation and characterization of salt tolerant phosphate solubilizing *Serratia marcescens* isolated from coastal area. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2016;10: 2401–2408.
128. Marra LM, De Oliveira-Longatti SM, Soares CRFS, De Lima JM, Olivares FL, Moreira FMS. Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015;46: 367–375. doi:10.1590/S1517-838246246220131102
129. Jha A, Saxena J, Sharma V. Investigation on Phosphate Solubilization Potential of Agricultural Soil Bacteria as Affected by Different Phosphorus Sources, Temperature, Salt, and pH. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2013;44: 2443–2458. doi:10.1080/00103624.2013.803557
130. Zhao Y, Liu D, Huang W, Yang Y, Ji M, Nghiem LD, et al. Insights into biofilm carriers for biological wastewater treatment processes: Current state-of-the-art, challenges, and opportunities. *Bioresource Technology*. 2019;288. doi:10.1016/j.biortech.2019.121619
131. Fulaz S, Vitale S, Quinn L, Casey E. Nanoparticle-Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. *Trends in Microbiology*. 2019; 1–12. doi:10.1016/j.tim.2019.07.004
132. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*. 2015;7: 493–512. doi:10.4155/fmc.15.6
133. Bales PM, Renke EM, May SL, Shen Y, Nelson DC. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. *Plos One*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0067950

134. Joe MM, Deivaraj S, Benson A, Henry AJ, Narendrakumar G. Soil extract calcium phosphate media for screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Agriculture and Natural Resources*. 2018;52: 305–308. doi:10.1016/j.anres.2018.09.014
135. Yadav H, Gothwal RK, Mathur S, Ghosh P. Bioactivation of Jhamarkotra rock phosphate by a thermotolerant phosphate-solubilizing bacterium *Bacillus* sp. BISR-HY63 isolated from phosphate mines. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 2014; 1–10. doi:10.1080/03650340.2014.980239
136. Sashidhar B, Podile AR. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Journal of Applied Microbiology*. 2010;109: 1–12. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04654.x
137. Naveed M, Ahmed I, Khalid N, Mumtaz AS. Bioinformatics based structural characterization of glucose dehydrogenase (gdh) gene and growth promoting activity of *Leclercia* sp. QAU-66. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014;45: 603–611. doi:10.1590/S1517-83822014000200031
138. Anzuay MS, Ciancio GR, Ludueña LM, Ludueña L, Angelini JG, Barros G, et al. Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. *Microbiological Research*. 2017;199: 98–109. doi:10.1016/j.micres.2017.03.006
139. Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*. 2014;26: 1–20. doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001
140. Preobrazhenskaya Y V., Voskoboev AI, Burd VN. Phosphatase activity of non-heme chloroperoxidase from the bacterium *Serratia marcescens*. *FEBS Letters*. 2003;536: 41–44. doi:10.1016/S0014-5793(03)00008-5
141. Liu X, Long D, You H, Yang D, Zhou S, Zhang S, et al. Phosphatidylcholine affects the secretion of the alkaline phosphatase PhoA in *Pseudomonas* strains. *Microbiological Research*. 2016;192: 21–29. doi:10.1016/j.micres.2016.02.001
142. Bheri M, Pandey GK. Protein phosphatases meet reactive oxygen species in plant signaling networks. *Environmental and Experimental Botany*. 2019. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.10.032
143. Behera Chandra B, Yadav H, Singh SK, Sethi BK, Mishra RR, Kumari S, et al. Alkaline phosphatase activity of a phosphate solubilizing *Alcaligenes faecalis*, isolated from Mangrove soil. *Biotechnology Research and Innovation*. 2017; 101–111. doi:10.1016/j.biori.2017.01.003
144. Alori ET, Glick BR, Babalola OO. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8. doi:10.3389/fmicb.2017.00971

145. Zhao Y, Hu M, Gao Z, Chen X, Huang D. Biological mechanisms of a novel hydro-electro hybrid priming recovers potential vigor of onion seeds. *Environmental and Experimental Botany*. 2018;150: 260–271. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.04.002
146. Nazir R, Zaffar MR, Amin I. Bacterial biofilms: The remarkable heterogeneous biological communities and nitrogen fixing microorganisms in lakes. *Freshwater Microbiology: Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems*. Elsevier Inc.; 2019. pp. 307–340. doi:10.1016/B978-0-12-817495-1.00008-6
147. Richardson AE, Simpson RJ. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiology*. 2011;156: 989–996. doi:10.1104/pp.111.175448
148. Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove-A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014;3: 97–110. doi:10.1016/j.bcab.2013.09.008

3.8. Anexos

3.8.1. Variograma preliminar sitio Pesca

En el sitio de Pesca, aunque ninguna de las variables presentó autocorrelación ($p > 0,05$) y no fue posible realizar los variogramas de distribución espacial, a continuación se presenta un variograma preliminar de las variables recuento de BPS y pH del suelo.

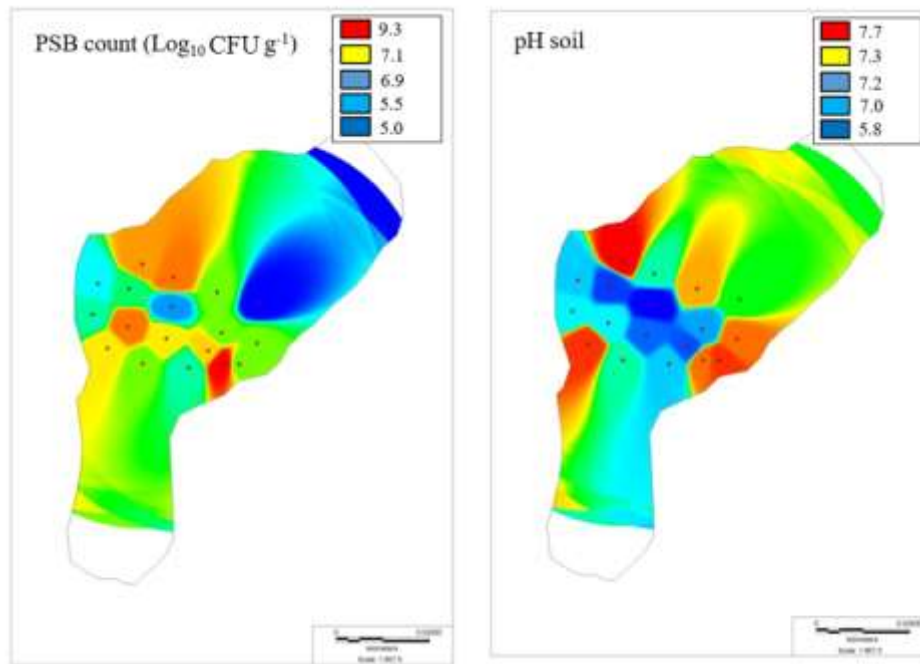


Figura 3.10. Variograma de las propiedades del suelo en el sitio Pesca. Izquierda, bacterias fosfato solubilizadoras y derecha, pH del suelo

3.8.2. Diseño experimental PB para el diseño del medio de cultivo para la producción de biomasa del cocultivo (*Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp.)

A continuación, se presenta el análisis de regresión del diseño experimental PB realizado para seleccionar el medio de cultivo para el cocultivo de BPS (Tabla 3.11).

Tabla 3.11. Análisis de regresión para las variables de respuesta recuento de BPS y concentración de P soluble del diseño Plackett Burman evaluando el cocultivo

Recuento de BPS (Log ₁₀ UFC mL ⁻¹)					P soluble (mg L ⁻¹)				
Factor	Valor F	Prob>f	Efecto Stand.	% Contrib.	Factor	Valor F	Prob>f	Efecto Stand	% Contrib.
		p valor					p valor		
Modelo	22,4	0,0003	5,16		Modelo	3,38	0,0482	88,19	
A-Roca fosfórica (g L ⁻¹)	1,50	0,0406	0,33	1,01	A-Roca fosfórica (g L ⁻¹)	1,71	0,0328	-8,34	6,22
B-Glucosa (g L ⁻¹)	4,16	0,0408	-0,54	2,83	B-Glucosa (g L ⁻¹)	3,80	0,0424	12,45	13,8424
C-Nitrogeno (g L ⁻¹)	3,2	0,0468	0,47	2,17	C-Nitrogeno (g L ⁻¹)	1,03	0,3447	6,47	3,74188
D- Agitación (rpm)	2,56	0,153	0,43	1,74	D- Agitación (rpm)	3,00	0,1270	-11,06	10,9316
E-Inóculo (%)	0,52	0,493	-0,19	0,35	E-Inóculo (%)	3,83	0,0911	12,51	13,9757
F: Tiempo (h)	122	<0,0001	-2,94	83,1	F: Tiempo (h)	6,90	0,0341	16,78	25,1555

3.8.3. Análisis de costos de las materias primas para producción del bioinoculante en medio MT11B

La **Tabla 3.12** presenta los resultados del análisis de costos realizado para comparar el valor de los componentes del medio MT11B con respecto al medio SMRS1.

Tabla 3.12. Análisis de costos para producir 1 L de medio MT11B y SMRS1. **(A)** Costo de los componentes del medio MT11B para producir 1 L. **(B)** Costo de los componentes del medio SMRS1 para producir 1 L.

(A)

Formulación del medio MT11B		Valor en USD 2020
Componente	g L ⁻¹	1 L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	0,0014
KCl	0,2	0,0048
MgSO ₄ H ₂ O	0,3	0,0008
MnSO ₄ H ₂ O	0,004	0,0003
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,0004	0,0003
NaCl	0,2	0,0003
Glucosa	2,5	0,0108
Hidrolizado de levadura cervecera	0,5	0,0033
Roca fosfórica	5	0,0014
TOTAL		0,02 USD

(B)

Formulación del medio SMRS1		Valor en USD 2020
Componente	g L ⁻¹	1 L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	0,0215
KCl	0,2	0,0048
MgSO ₄ H ₂ O	0,3	0,0008
MnSO ₄ H ₂ O	0,004	0,0008
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,0004	0,0003
NaCl	0,2	0,0003
Glucosa	10	0,6055
Extracto de levadura	0,5	0,0625
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5	0,6215
TOTAL		1,3 USD

Capítulo 4.

Producción y caracterización de un biochar a partir de aserrín de pino caribe empleando transformación térmica a bajas temperaturas para la obtención de un portador para el bioinoculante

Tabla de contenido

4.1.	Introducción.....	154
Sección 1. Producción y caracterización de un BC a partir de aserrín de pino		158
4.2.	Materiales y métodos	158
4.2.1.	Obtención y caracterización química del APC como material de partida para producción de biochar.....	158
4.2.2.	Diseño factorial 2 ³ para la selección de las condiciones de producción del BC	159
4.2.2.1.	Preparación del aserrín de pino para producción de biochar.....	160
4.2.3.	Estudios complementarios de caracterización de APC y BC T2 y T8	161
4.2.4.	Estudios específicos de caracterización del APC y BC T2.....	161
4.2.4.1.	Análisis elemental	162
4.2.4.2.	Determinación del grado de aromaticidad por extracción química.....	162
4.2.4.3.	Espectroscopia de infrarrojo con transformación de Fourier (FTIR)	163
4.2.4.4.	Microscopía electrónica de barrido (MEB/EDS)	163
4.2.5.	Formulación del BC con BPS empleando la técnica de impregnación húmeda a bajas temperaturas	164
4.2.5.1.	Reactivación de las BPS.....	164
4.2.5.2.	Formulación por impregnación húmeda de las BPS al biochar.....	164
4.2.5.3.	Pruebas de estabilidad de las BPS sobre el biochar en función del tiempo	165
4.2.6.	Estudios de adsorción de las BPS y ortofosfatos al biochar	166
4.2.6.1.	Determinación del punto de carga cero (PZC).....	166
4.2.6.2.	Efecto de diferentes pH sobre la adsorción de las BPS al biochar	166
4.2.6.3.	Efecto de diferentes pH sobre la adsorción de ortofosfatos al biochar.....	167
4.2.7.	Técnicas de caracterización complementarias para PS y biochar.....	168
4.2.7.1.	Humedad en porcentaje (%).....	168
4.2.7.2.	Densidad aparente (g cm ⁻³)	169
4.2.7.3.	Volumen de saturación	169
4.2.7.4.	Porosidad en porcentaje (%).....	169
4.2.7.5.	pH	170
4.2.7.6.	Análisis próximo	170
4.2.7.7.	Carbono volátil en porcentaje (VC).....	170
4.2.7.8.	Carbono fijo en porcentaje (CF)	170
4.2.7.9.	Cenizas en porcentaje	171
		151

4.2.7.10.	Carbono orgánico total por ignición (COT)	171
4.2.7.11.	Rendimiento en biochar y CF.....	172
4.3.	Resultados	173
4.3.1.	Caracterización inicial del APC.....	173
4.3.2.	Diseño factorial 2 ³ para la selección de las condiciones de producción de biochar.....	174
4.3.3.	Estudios complementarios de caracterización de APC y biochar T2 y T8.....	178
4.3.4.	Estudios específicos de caracterización de APC y BC T2.....	179
4.3.5.	Espectroscopía de infrarrojo con arreglos de Fourier	181
4.3.6.	Microscopía electrónica de barrido para APC y BC.....	182
4.3.7.	Estudios de adsorción para las bacterias fosfato solubilizadoras	183
4.3.8.	Estudios de adsorción para ortofosfatos.....	186
4.3.9.	Coinoculación de las BPS al BC y caracterización.....	188
4.3.10.	Estudios de viabilidad de las BPS en el BC	190
4.4.	Discusión	192
4.4.1.	Caracterización del APC y el BC	192
4.4.2.	Diseño factorial 2 ³ para la selección de las condiciones de producción de biochar.....	196
4.4.3.	Espectroscopía de infrarrojo con arreglos de Fourier para BC T2.....	199
4.4.4.	Estudios de adsorción para las bacterias fosfato solubilizadoras	201
4.4.5.	Estudios de adsorción para ortofosfatos.....	202
4.4.6.	Formulación de las bacterias fosfato solubilizadoras al biochar y caracterización	203
4.5.	Conclusión	205

Sección 2. Producción de biochar a partir de residuos lignocelulósicos y polietileno

	oxodegradable, enriquecido con BPS	206
4.6.	Materiales y métodos	206
4.7.	Resultados	208
4.7.1.	Producción y uso del biochar (BC) en invernadero, caracterización y propiedades	208
4.7.2.	Ensayos de crecimiento de <i>Allium cepa</i> L. en invernadero.....	211
4.8.	Discusión	212
4.9.	Conclusión	214
4.10.	Productos científicos derivados del objetivo específico 2	216
4.10.1.	Artículos científicos	216
4.10.2.	Formación de talento humano: Trabajos de Grado de progrado codirigidos, asociados al objetivo específico 2.....	¡Error! Marcador no definido.
4.10.3.	Participación en eventos científicos	217

4.11.	Referencias	218
4.12.	Anexos	228
4.12.1.	Estudios de adsorción de las BPS al biochar.....	228

4.1. Introducción

Colombia es un país con vocación forestal, tiene un amplio potencial para el desarrollo de programas de reforestación comercial y la localización geoestratégica es ideal para el comercio de los productos agroforestales del país [1,2]. Con fines comerciales los géneros y especies más cultivados son: *Tabebuia rosea*, *Tectona grandis*, *Eucalyptus pellita* y *Pinus caribaea* [3,4]. Para su producción las empresas forestales implementan todo el proceso productivo que incluyen la propagación de material vegetal en vivero, plantaciones forestales y zonas de aprovechamiento [4]. En la etapa de aprovechamiento se generan grandes cantidades de residuos sólidos, ricos en biomasa lignocelulósica (hojas, aserrín, viruta, corteza, entre otros) que pueden representar hasta 50 % de la madera procesada [4–6]. La degradación de estos residuos sólidos orgánicos (RSO) es lenta dado que tiene un alto contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa [7]. Estos polímeros estructurales son complejos, resistentes e hidrofóbicos por lo que la transformación biológica es más difícil [7,8]. Un elevado porcentaje de estos residuos no son aprovechados o se emplean crudos (sin transformar) en otros procesos agroindustriales como, por ejemplo: Mezclas llenantes para la producción de compost, material aislante para las granjas de levante de pollos, cerdos, ganado estabulado y en mezcla con cascarilla de arroz lo emplean como hidroretenedores y/o trampas físicas para hongos fitopatógenos (*Scerotium cepivorum*, *Alternaria porri*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Botrytis squamosa*) que afectan cultivos de hortalizas como *Allium cepa* L o cebolla de bulbo [3,4,9,10]. Adicionalmente, la corteza y aserrín, con diferentes grados de maduración o transformación, son utilizados como sustratos de siembra para propagación de material vegetal en viveros forestales ya sea solos o enriquecidos con microorganismos benéficos y fertilización mineral [3,11–13].

Si bien el uso de estos subproductos agroindustriales crudos o parcialmente transformados es generalizada a nivel mundial, se pueden evaluar otras alternativas de aprovechamiento como la conversión térmica o pirólisis. Mediante este proceso físico se obtienen nuevos productos como biochar (BC), aceites, gases, compuestos volátiles, entre otros [14,15]. En este sentido el aserrín de pino caribe (APC) es uno de los materiales crudos más utilizados para la producción de BC, porque es económico, se produce en grandes cantidades y se pueden obtener diferentes tipos de productos dependiendo de las condiciones de producción para obtener el BC [16,17]. Adicionalmente, el aserrín tiene un contenido apreciable de lignina, este heteropolímero constituido por subunidades de fenil propano (Alcohol, sinapílico, alcohol cumarílico y alcohol

coniferílico) tiene alto grado de aromaticidad, enlaces éter y carbono-carbono, que favorecen la obtención de un BC estable y condensado, a partir de estos compuestos aromáticos [18,19].

El BC sólo, es un material rico en carbono condensado y estable, que se obtiene por la conversión térmica o pirólisis bajo condiciones reducidas o en ausencia de oxígeno, de la biomasa lignocelulósica [20]. Se caracteriza por tener alta área superficial elevada porosidad y densidad de carga, lo que favorece su capacidad para retener nutrientes, agua y microorganismos [21]. Es utilizado exitosamente en agricultura como enmienda orgánica, porque ayuda a mejorar la estabilidad estructural del suelo, porosidad, conductividad hidráulica, aireación del suelo y capacidad de intercambio catiónico. Lo que genera incrementos en la fertilidad, productividad del suelo y los cultivos [22–25]. Por otro lado, el BC ofrece un nicho favorable para los microorganismos del suelo, permitiendo que ellos alcancen elevadas velocidades de crecimiento, poblaciones elevadas y estén protegidos de factores ambientales adversos [22]. La proliferación de microorganismos benéficos, estimulación de actividad rizogénica, movilización de nutrientes y disminución de algunos fitopatógenos, son condiciones favorables para el crecimiento vegetal al emplear BC como acondicionador de suelos [26–30].

Por otro lado, el BC se puede mejorar aún más al emplearlo como soporte orgánico ó matriz sólida para la inmovilización, formulación o co inoculación de microorganismos benéficos para suelo y plantas [27,31,32]. De esta manera se produce un biomaterial doble propósito ya que sirve como soporte para las bacterias, ayuda a mantener la densidad poblacional y retiene las bacterias en los macro y microporos. Uniendo las propiedades del BC y las bacterias benéficas, se pueden obtener una serie de nuevos bioproductos como acondicionadores de suelos, biofertilizantes en presentación sólida o un sustrato de siembra para viveros [33–36]. Algunos de los grupos bacterianos soportados o inmovilizados sobre BC, más frecuentemente reportados por la literatura incluyen a las bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias promotoras de crecimiento vegetal, microorganismos biocontroladores y bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) [10,27,32,35].

En relación con el ciclo del fósforo (P) este elemento es considerado como nutriente esencial y deficitario para la nutrición de plantas. Es necesario un aporte frecuente y manejo sostenible, para mantener por largos períodos de tiempo la fertilidad del suelo y la productividad de los

cultivos [37,38]. Las prácticas agrícolas tradicionales e intensivas suplen esta deficiencia aplicando grandes dosis de fertilizantes químicos, que a largo plazo afectan la calidad y cantidad de la materia orgánica del suelo [39]. Para disminuir el impacto ambiental del uso excesivo de fertilizantes químicos, una alternativa es el uso de bacterias fosfato solubilizadoras (BPS). Estos microorganismos pueden solubilizar o mineralizar diferentes formas de fósforo no disponible, para liberar formas inorgánicas disponibles como los iones ortofosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) [34,40].

Las BPS pueden emplearse en presentaciones líquidas o formuladas en diferentes tipos de materiales. Siempre y cuando se mantenga su viabilidad, concentración y actividad biológica, para que puedan sobrevivir al ser aplicadas a suelos [36]. Donde la densidad poblacional de otros microorganismos es alta y podría llegar a afectar su desempeño [41,42]. La diversidad en la composición o actividad de la comunidad microbiana inducida por el BC no sólo afecta los ciclos de nutrientes y el crecimiento de las plantas, sino también el ciclo de la materia orgánica del suelo [35]. Por ende, la aplicación integrada de BC y BPS, podría ayudar a incrementar la disponibilidad de P en suelo porque el BC ayuda a mantener la viabilidad de las BPS para que puedan solubilizar P a partir de compuestos de fósforo inorgánico con diferentes grados de solubilidad [32,43]; convirtiéndose en una estrategia amigable con el medio ambiente, ya que integra el uso, conversión y aprovechamiento de un residuo agroindustrial, que servirá como soporte orgánico para las BPS. Aportando un efecto benéfico combinado en el suelo y en el crecimiento de las plantas [35,44]. El BC junto con la inoculación de BPS podría ser estrategia biotecnológica para incrementar la solubilización de P y posiblemente incrementar la disponibilidad del elemento para mejorar del crecimiento de las plantas y la calidad nutricional de los cultivos [34].

Por esta razón, en la primera parte del presente capítulo se presenta la metodología, resultados y discusión, relacionadas con la producción y caracterización, de un BC a partir de aserrín de pino. Para emplearlo como soporte orgánico para la inmovilización o coinoculación de las bacterias fosfato solubilizadoras *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. y *Kosakonia* sp. Al biofertilizante en presentación sólida se le realizaron análisis físicos, químicos, microbiológicos y estudios de viabilidad o estabilidad de las bacterias en el BC.

El presente capítulo tiene una segunda sección en la que se presentan los resultados de un estudio en paralelo que se realizó empleando las mismas bacterias para formular un BC complementario al del aserrín de pino. El BC evaluado es esta segunda sección se produjo a partir de la conversión térmica de un material crudo compuesto por corteza de pino caribe, servilletas de celulosa e hidrolizado de levadura cervecera. Que se utilizó para el cotratamiento de biomasa lignocelulósica y polietileno de baja densidad, empleando a *Pleurotus ostreatus* a escala de laboratorio. El BC producido se empleó para inmovilizar a las BPS y evaluar su efecto sobre el crecimiento preliminar de semillas de *A. cepa* L. a escala de invernadero [32,45].

Sección 1. Producción y caracterización de un BC a partir de aserrín de pino

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Obtención y caracterización química del APC como material de partida para producción de biochar

El material de partida para producción del BC fue aserrín de pino caribe (APC) el cual proviene de una empresa procesadora de madera colombiana y fue utilizado previamente en dos proyectos de investigación titulados: Producción de sustratos bio enriquecidos para propagación de material vegetal en vivero empleando subproductos de madera de pino, eucalipto, teca y roble y el proyecto, optimización de estrategias de siembra de materiales forestales con el uso de sustratos biotransformados enriquecidos con microorganismos benéficos (Fig. 4.1), [12,13]. Parte de la caracterización inicial la realizó Rojas-Higuera *et al.*, (2013), y otros análisis se realizaron por el laboratorio externo AGRILAB S.A.S [11].



Figura 4.1. Subproductos de aserrío empleados en el capítulo 4. (A). Aserrín de pino producido en las máquinas de aserrado utilizado en la sección 1 del capítulo 4. (B). Aserrín de pino en la zona de almacenamiento fuera de la planta (C). Corteza de pino utilizada en aserrado utilizado en el sub capítulo 3.2. (Fuente: Pedroza & Díaz., (2013); Chacón., (2019))

El APC se tamizó secuencialmente usando tamices No 10, 12 y 20, para obtener un tamaño de partícula de $4-5 \pm 1$ mm. Se secó 24 horas a 70 ± 2 °C y se preservó en bolsa plástica sello pack para controlar la humedad [32,46].

Se realizó caracterización con la finalidad de conocer la composición nutricional completa. Los parámetros analizados incluyeron carbono orgánico, nitrógeno total, elementos (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , P_2O_5 , B, Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) [46]. Adicionalmente, se determinó la densidad [47], porcentaje de porosidad [3], volumen de saturación [3,11], y relación de aromaticidad o madurez expresada como E_4/E_6 [32,48,49]. Con los resultados de C, H, O, N obtenidos en el análisis elemental se calcularon las relaciones molares H/C, O/C y (O+N)/C.

4.2.2. Diseño factorial 2^3 para la selección de las condiciones de producción del BC

Para la selección de las condiciones que favorecen la producción del BC se realizó un diseño factorial 2^3 con tres puntos centrales (PC). Los tres factores evaluados fueron A: temperatura (°C) B: tiempo (h) y C: inyección de N_2 . El diseño generó 8 tratamientos que se presentan en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Diseño factorial 2^3 para la selección de las condiciones de operación para la producción del BC.

Tratamiento	Factor A	Factor B	Factor C
	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Inyección de N_2 (mL min ⁻¹)
T1	300	1	0
T2	500	1	0
T3	300	3	0
T4	500	3	0
T5	300	1	150
T6	500	1	150
T7	300	3	150
T8	500	3	150
Punto central (3)	400	2	75

Una vez establecidas las condiciones de operación de cada uno de los tratamientos del diseño factorial 2^3 , se transfirió cada recipiente que contenía el aserrín previamente preparado como se explicó en el numeral anterior, a una mufla del 20 L Labtech™ con control de temperatura y tiempo, la cual cuenta con un puerto de entrada y salida para la adición de nitrógeno (N_2) y se realizó el tratamiento térmico según las condiciones generadas en el diseño factorial (**Tabla 4.1**).

Para controlar el factor tiempo, se cronometró el mismo a partir del momento en que la mufla alcanzó la temperatura a evaluar. El factor temperatura se controló utilizando el termostato y el sensor de temperatura incorporados en la mufla para ajustar cada valor en grados Celsius (°C). Para los tratamientos que lo requirieron, la inyección o pulsos de N₂ se adicionaron a razón de 150 mL min⁻¹ inyectando a través del puerto para entrada de gases una vez alcanzada la temperatura a evaluar. Culminado el proceso térmico, el BC se retiró de la mufla y se colocó nuevamente en campanas de anaerobiosis para evitar la adquisición de humedad.

Para determinar el efecto de los tres factores a dos niveles, sobre las propiedades físicas y químicas de los diferentes tipos de BC se realizó análisis próximo de las variables humedad, carbono orgánico (COT) [23,50], cenizas, fracción fija o carbono fijo (CF), fracción volátil o carbono volátil (VC) [21,51–53], rendimiento en BC [54] y rendimiento en CF. Como variables de respuesta para realizar el análisis estadístico y toma de decisión se seleccionó el CF y el Y_{BC}. Las demás variables mencionadas se midieron, pero no fueron incluidas en el análisis estadístico. Para determinar los mejores tratamientos del diseño factorial 2³ se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias empleando los programas Design-Expert® (Stat-Ease Inc. 2017. Versión 11.0. Minneapolis, MN: Stat-Ease) y SAS® (SAS Institute 2017. versión STAT 14.3. Cary, NC: SAS Institute), empleando únicamente la variable de respuesta carbono fijo.

4.2.2.1. Preparación del aserrín de pino para producción de biochar

Se colocaron 100 ± 5 g del material crudo o aserrín de pino caribe (APC) en recipiente rectangular de aluminio de 250 g. A continuación, el recipiente se introdujo dentro de una campana de anaerobiosis de 2,5 L marca 3M® junto con un sobre de Anaerogen 3M® para generar el desplazamiento del O₂ por el catalizador del sobre, durante 12 horas a 19 ± 2 °C. Posteriormente se realizó el proceso térmico en una mufla de 20 L; en la figura 2 se presentan los pasos previos para la producción del BC (Fig. 4.2).



Figura 4.2. Sistema para producción de BC (A). Aserrín de pino seco y tamizado (B). Cámara de Anaerogen® con el aserrín y el catalizador. (C). Sistema para el suministro de Nitrógeno. (D) Mufla LabTech® empelada como termoreactor (Fuente: Chacón., (2019), Blanco., (2020))

4.2.3. Estudios complementarios de caracterización de APC y BC T2 y T8

Posterior a la determinación de los mejores tratamientos del diseño factorial (T2 y T8) que favorecían la producción de BC a partir de APC, se realizó la producción de un nuevo lote para verificar la reproducibilidad de resultados y complementar los estudios de caracterización que incluyeron humedad (%), [46], densidad (g cm^{-3}) [47], volumen de saturación (mL) [11], porosidad (%), [3], tamaño de partícula (mm), [55], y pH. Adicionalmente se realizó el análisis próximo, determinando las variables de % de carbono orgánico total por ignición (COT), rendimiento en BC (Y_{BC}), % de carbono fijo (CF), % de carbono volátil (VC) y % de cenizas, siguiendo las metodologías reportadas por la AASHTO T 267–86, International Biochar Initiative, (2012) y Yang *et al.*, (2017), [23,50,54]. Las técnicas detalladas se presentan en un numeral al final de la metodología.

4.2.4. Estudios específicos de caracterización del APC y BC T2

En este punto del estudio se tomó la decisión de continuar únicamente con el BC T2 (que se denominó BC), para incorporarlo como componente del biofertilizante compuesto por BPS y BC (BC/BPS). La toma de decisión se basó en el resultado de las variables respuesta % CF y Y_{BC} que fueron significativamente diferentes en T2 en comparación con T8 (Figura 4.6).

Adicionalmente las condiciones de producción de BC T2 fueron mas favorables que las de BC T8 (500 ± 5 °C por 1 h sin inyección de N_2 y 500 ± 5 °C por 3 h con inyección de N_2 , respectivamente). Para estas muestras se realizaron estudios específicos de caracterización que incluyeron densidad ($g\ cc^{-1}$), [47], volumen de saturación (mL), [11], porcentaje de porosidad (%), análisis elemental (C, O, H y N) y relaciones de aromaticidad o condensación expresada como E_4/E_6 para el sobrenadante de la extracción alcalina (Sob/ E_{Alk}), sobrenadante de la extracción ácida (Sob/ E_{Ac}) y el sedimento de la extracción ácida (SD/ E_{Ac}), [56], espectroscopia de infrarrojo con transformación de Fourier (FTIR), [57,58] y microscopía electrónica de barrido acoplada a energía dispersiva de rayos X (MEB/EDS), [58]. Las metodologías de las técnicas mencionadas anteriormente se presentan a continuación.

4.2.4.1. Análisis elemental

El análisis elemental se realizó empleando la técnica de oxidación completa e instantánea de la muestra, mediante la combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000 °C. Los diferentes productos de combustión CO_2 , H_2O , N_2 y SO_x fueron transportados mediante el gas portador (Helio) a través de un reactor de reducción y después se separaron selectivamente en columnas específicas para ser luego desorbidos térmicamente. Finalmente, los gases pasaron de forma separada por un detector de conductividad térmica que proporcionó una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla. El análisis elemental fue un servicio externo realizado por el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, bajo las siguientes condiciones: el equipo utilizado fue un Thermo Flash 2000, con una temperatura en el reactor de 950 °C y flujo de He y O_2 de $140\ mL\ min^{-1}$ y $250\ mL\ min^{-1}$ respectivamente. Con una columna de separación con llave de politetrafluoroetileno (PTFE) con longitud de 200 cm; OD 6 mm; ID 5 mm a una temperatura de 65 °C. Con los resultados de C, H, O, N obtenidos en el análisis elemental se calcularon las relaciones molares H/C, O/C y (O+N)/C.

4.2.4.2. Determinación del grado de aromaticidad por extracción química

Para determinar las relaciones E_4/E_6 , se realizaron tres pasos de extracción química. El primer paso se denominó extracción alcalina y consistió en adicionar 4 g de APC o BC a 40 mL de KOH 0,5 M y la mezcla se agitó por 24 horas a 120 rpm en un agitador horizontal marca Heidolp®. Se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 8000 rpm por 10 minutos

empleando una centrifuga Sorvall®. A continuación, se determinaron las absorbancias de las muestras a 465 nm y 665 nm (E_4/E_6), empleando como blanco agua destilada y un espectrofotómetro marca Génesis 20®. El cociente de las dos longitudes de onda corresponde al resultado del primer paso de extracción y se identificó con las siglas (Sob/ E_{Alk}). Esta extracción permite extraer los compuestos aromáticos y alifáticos totales solubles a pH alcalino.

Para el segundo paso de extracción se utilizó el sobrenadante proveniente de la extracción alcalina, al cual se le realizó una extracción ácida con ácido clorhídrico 6 N. Se tomaron 10 mL del Sob/ E_{Alk} y 10 mL de HCl 6 N, la mezcla se homogenizó por 24 h a 120 rpm. El sobrenadante producto de la extracción ácida se recuperó por centrifugación por 10 minutos a 8000 rpm. A este sobrenadante nuevamente se le determinó la absorbancia a 465 nm y 665 nm, para determinar la relación E_4/E_6 , para este paso de extracción el cual se identificó con las siglas (Sob/ E_{Ac}). Esta extracción permite recuperar la mayor proporción de compuestos alifáticos y algunos compuestos aromáticos, pero con menor grado de condensación que son solubles a pH ácido.

El último paso de extracción consistió en recuperar el sedimento de la extracción ácida y resuspenderlo con una solución de HCl:KCl 0,1 N en proporción 1:1 por un período de 24 h a 120 rpm y nuevamente se centrifugó por 10 min a 8000 rpm. En el sobrenadante obtenido se determinaron las absorbancias a 465 nm y 665 nm, para calcular la relación E_4/E_6 para esta extracción y se identificó con las siglas (SD/ E_{Ac}), [48,56].

4.2.4.3. Espectroscopia de infrarrojo con transformación de Fourier (FTIR)

Los grupos funcionales presentes en las muestras y el cambio de los mismos a partir del proceso de transformación térmica se determinaron por espectroscopía de infrarrojo. Se empleó un espectrofotómetro Shimadzu IR Prestige-21 con módulo ATR, realizando 40 scans con resolución de 4 cm^{-1} , realizando un barrido entre los 4000 y 600 cm^{-1} [55].

4.2.4.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB/EDS)

Las características superficiales y la morfología del APC, el BC sólo y coinoculado con las bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) se evidenciaron por medio de microscopía electrónica de acoplada a energía dispersiva de rayos X (MEB/EDS) (microscopia electrónica de

barrido/espectroscopia de energía dispersiva). Se empleó un microscopio de barrido de electrones JEOL, modelo JSM 6490-LV con potencia entre 10 - 20 kV y magnificaciones entre 150X y 17000X. Previo a su análisis, las muestras fueron recubiertas con oro, en condiciones de vacío con un Metalizador Desk IV en un sólo ciclo de revestimiento [32].

4.2.5. Formulación del BC con BPS empleando la técnica de impregnación húmeda a bajas temperaturas

Para formular o inmovilizar las BPS del bioinoculante líquido producido en el [capítulo 3](#) sobre el BC elaborado en el presente capítulo para obtener el biofertilizante (BC/BPS) se realizaron las pruebas y procedimientos que se describen a continuación.

4.2.5.1. Reactivación de las BPS

Las bacterias utilizadas son bacilos Gram negativos identificados como *Pseudomonas* sp., *Kosakonia* sp y *Serratia* sp., las cuales fueron aisladas a partir de suelos en los que se cultiva *Allium cepa* en el Departamento de Boyacá, Colombia. Se reactivaron a partir del banco de células primario [59] preservado en glicerol a -20 °C y se cultivaron en agar BHI por 24 h a 30 ± 2 °C. La producción de bioinoculante se realizó en el medio MT11B, por un período de 6 horas a 30 ± 2 °C y 200 rpm, empleando un Shaker New Brunswick Scientific TM ([capítulo 3](#)). Para el control de calidad se realizaron diluciones seriadas y recuento en agar MT11B para determinar la población inicial de BPS. En el sobrenadante del cultivo se la determinación de pH y concentración de ortofosfatos empleando el Kit Test Fosfatos Spectroquant[®] de Merck (MQuantTM Test Fosfatos) [60]. El bioinoculante concentrado se diluyó 1/1000 para obtener una concentración final de 10×10^7 BPS mL⁻¹ de acuerdo a los parámetros establecidos por la [Norma Técnica Colombiana 5842 del 2011](#) para bioinsumos de uso agrícola, específicamente para inoculantes elaborados con microorganismos solubilizadores de fosfato [61].

4.2.5.2. Formulación por impregnación húmeda de las BPS al biochar

Se produjo y caracterizó un nuevo lote de BC (200 g) y se le adicionó de acuerdo con los resultados de el volumen de saturación una cantidad conocida en mililitros (200 mL) del consorcio de BPS en concentración de 10×10^7 BPS mL⁻¹. Bajo condiciones de esterilidad y cerca al mechero se homogenizó el BC con el bioinoculante compuesto por *Pseudomonas* sp., *Kosakonia* sp. y *Serratia* sp., hasta obtener una pasta uniforme y húmeda ([Fig. 4.3](#)), [32]. Posteriormente se

tomaron muestras para realizar diluciones seriadas hasta 10^{-7} para determinar el recuento inicial en BPS g^{-1} de BC. A continuación, el BC formulado con BPS (BC/BPS/I) se incubó por 24 h a 30 ± 2 °C en una incubadora marca Memmert[®], como protocolo de reactivación secundaria para las bacterias injuriadas por la formulación (BC/BPS/SC) la cuál fue reportada la patente No WO 2014/167409 Al [62]. El BC/BPS/SC se utilizó para realizar las pruebas de estabilidad de las BPS a 19 ± 2 °C en función del tiempo y los estudios de adsorción de las bacterias al BC empleando diferentes pH.

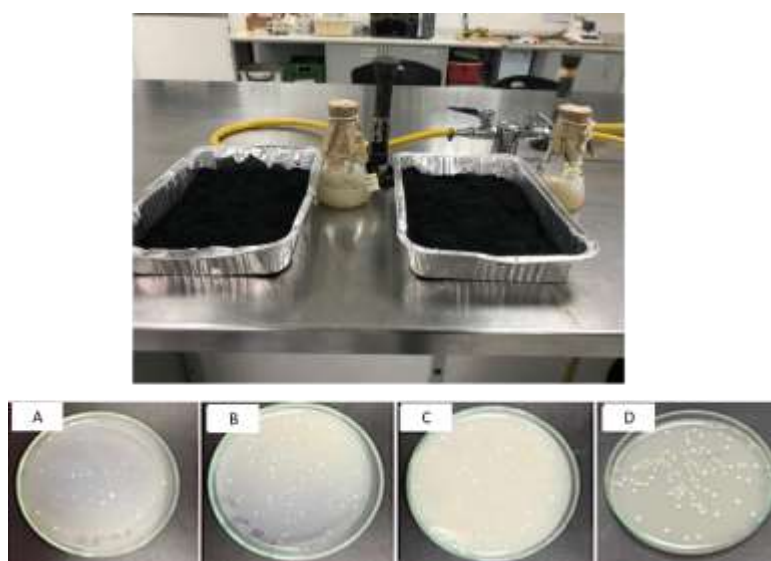


Figura 4.3. Formulación del biofertilizante a base de BC y *Pseudomonas* sp., *Kosakonia* sp. y *Serratia* sp. producidas en medio MT11B por 6 h a 200 rpm. (A, B) Aspecto de las colonias a tiempo cero. (C y D) Aspecto de las colonias después de la reactivación secundaria. Fuente: Chacón., (2019).

4.2.5.3. Pruebas de estabilidad de las BPS sobre el biochar en función del tiempo

Para este experimento se utilizó el bioinoculante a una concentración de 1×10^7 BPS mL^{-1} ($7,0 \text{ Log}_{10}$ BPS g^{-1}) y posteriormente se realizó la dosificación con el BC llevando a cabo el protocolo de impregnación húmeda y reactivación secundaria descrito en el numeral anterior. Posteriormente se distribuyeron por triplicado 3 g del BC/BPS en frascos cilíndricos de vidrio de 10 mL estériles y se incubaron por 150 días a 19 ± 2 °C en oscuridad. Los muestreos se realizaron a los 0, 2, 8, 30, 60, 90, 120 y 150 días, como variables respuesta se determinó el recuento de BPS totales y recuento por morfotipos (BPS g^{-1}), pH [46] y el porcentaje de humedad [46]. Los resultados de recuento expresados en BPS g^{-1} se transformaron a Log_{10} BPS g^{-1} para determinar el porcentaje de estabilidad (%) tomando como el 100 % los recuentos obtenidos en el tiempo cero [36]. Se realizó una comparación de medias entre tiempos de muestreo para

determinar diferencias significativas, teniendo en cuenta que las BPS no perdieran más del 20 % de la estabilidad en función del tiempo. Posteriormente se realizó una prueba de comparaciones múltiples post-hoc Tukey. El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico Minitab® (Minitab 18. Ink. 2018. versión 18,0).

4.2.6. Estudios de adsorción de las BPS y ortofosfatos al biochar

Para evaluar si al BC se adsorben las bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) y los ortofosfatos, se realizaron tres experimentos independientes. El primero fue determinar el punto de carga cero del BC, el segundo los estudios de adsorción de las BPS a tres pH y los estudios de adsorción de ortofosfatos también a tres pH. Para estas pruebas se produjo un nuevo lote de BC y se dividió en dos submuestras. Una submuestra se utilizó para los estudios de adsorción y la otra para la co inoculación de las BPS.

4.2.6.1. Determinación del punto de carga cero (PZC)

Se determinó a través del método de adsorción de sales empleando KCl. Se utilizaron recipientes de vidrio de 50 mL, cada réplica contenía 20 mL de KCl (10 mM) ajustado a pH que variaron entre 1,0 a 11,0 (NaOH o HCl 0,1 N). A cada recipiente se le adicionaron 0,02 g de BC y se mezclaron por 24 h a 120 rpm empleando un agitador horizontal marca Heidolp®. Posteriormente, las soluciones libres de BC se recuperaron por centrifugación por 10 minutos a 8000 rpm. Los sobrenadantes se recuperaron, se midieron los pH finales y se graficó en el eje Y el valor de pH medido con el sensor después de 24 h y el eje X valor de pH inicial (1,0-11,0). El valor de PZC se obtuvo de la intersección de la curva $pH_i = pH_f$ [63].

4.2.6.2. Efecto de diferentes pH sobre la adsorción de las BPS al biochar

Se evaluó el efecto de tres pH sobre la adsorción de las bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) al BC. Las BPS se produjeron siguiendo la metodología reportada por [Moreno-Bayona et al., \(2019\) \[32\]](#) y la concentración inicial se ajustó en 1×10^7 BPS mL⁻¹. En frascos Schott® de 250 mL se colocaron 100 mL de las BPS y se ajustaron los pH (3,0, 5,0 y 7,0 \pm 0,2) con hidróxido de sodio 0,5 M o ácido clorhídrico al 0,5 M. Posteriormente, se adicionó a cada triplicado 2,0 gramos de BC y los recipientes se colocaron en agitación a 120 rpm por 60 minutos a 19 ± 2 °C en un agitador horizontal marca Heidolp®. Se tomaron muestras al inicio y cada 10 minutos para realizar diluciones decimales y siembra de 0,1 mL de cada dilución en agar BHI. Utilizando los

datos de recuento expresados como logaritmo en base 10 de UFC g⁻¹ adsorbidas al BC se calculó el valor de q (cantidad de células absorbidas por gramo de BC) utilizando la [Ecuación I](#).

$$q = \frac{V(C_0 - C)}{X} \quad (\text{Ec. I})$$

Dónde: V= Volumen de la solución (L), C= Concentración de células (Log₁₀ de UFC g⁻¹), C₀= Concentración inicial de células en la solución (Log₁₀ de UFC g⁻¹), X= gramos de BC en peso seco.

Posteriormente, se determinaron las constantes de adsorción y los valores q para las células empleando modelos de linealización como: Pseudo-primero orden, pseudo-segundo orden, *Elovich*, difusión intrapartícula y difusión en película líquida, cuyas ecuaciones se presentan en la [Tabla 4.2](#). Cada experimento se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de los mismos y su respectiva desviación estándar [64].

Tabla 4.2. Modelos cinéticos de adsorción

Modelos cinéticos	Ecuación	Referencia
Modelo de pseudo-primero orden	$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t})$	[65]
Modelo de pseudo-segundo orden	$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$	[66]
Ecuación de <i>Elovich</i>	$q^t = \left(\frac{1}{\beta}\right) \ln(\alpha \cdot \beta) + \left(\frac{1}{\beta}\right) \ln(t)$	[67]
Ecuación de difusión intrapartícula	$q_t = k_{id} t^{0.5} + C$	[65]
Modelo de difusión en película líquida	$\ln(1 - F) = -k_{fd} t$	[68]

4.2.6.3. Efecto de diferentes pH sobre la adsorción de ortofosfatos al biochar

Se evaluó el efecto de tres pH sobre la adsorción de fósforo (P) al BC. Se preparó una solución estándar de PO₄-P a una concentración de 100 mg L⁻¹ a partir de una solución de KH₂PO₄ [60]. En frascos de vidrio de 100 mL se colocó 1 g de BC y 50 mL de la solución estándar de PO₄-P para realizar las cinéticas de adsorción de P al BC. Los recipientes se mantuvieron en agitación a 150 rpm y 25 ± 2 °C durante 120 horas a pH 3,0, 5,0 y 7,0 ± 0,2 en una incubadora con agitación Scientific® CVP-500. Se tomaron muestras del sobrenadante al inicio, a los 20, 40 y 80 minutos y a las 2, 24, 48 y 120 horas y se determinó la concentración de P residual en el

sobrenadante (mg L^{-1}) por medio de la técnica colorimétrica de molibdato-vanadato de [John \(1970\) \[69\]](#). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Utilizando los datos de la concentración de P expresados en mg g^{-1} adsorbido al BC se calculó el valor de q (cantidad de P absorbido por gramo de BC) utilizando la [Ecuación I](#). Dónde: V = Volumen de la solución (L), C = Concentración de P (mg g^{-1}), C_0 = Concentración inicial de P en la solución (mg L^{-1}), X = gramos de BC en peso seco.

Posteriormente, se determinaron las constantes de adsorción y los valores q para el P empleando modelos de linealización: Pseudo-primero orden, pseudo-segundo orden, *Elovich*, difusión intrapartícula y difusión en película líquida, cuyas ecuaciones se presentan en la [Tabla 3.3](#). Cada experimento se realizó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de los mismos y su respectiva desviación estándar [\[64\]](#).

4.2.7. Técnicas de caracterización complementarias para PS y biochar

Las técnicas complementarias que se realizaron al PS y al BC incluyen humedad, densidad, volumen de saturación, pH y análisis próximo (VC, CF, cenizas, COT y rendimiento en carbono fijo y BC).

4.2.7.1. Humedad en porcentaje (%)

Se pesó previamente una capsula de porcelana y se registró el peso. Se adicionó entre 1 y 2 g del material a analizar y se pesó nuevamente. Posteriormente se realizó secado de la unidad experimental a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas en un horno eléctrico. El porcentaje de humedad se calculó empleando la [Ecuación II](#). Las determinaciones se realizaron por triplicado [\[3,11,46\]](#).

$$\% H = \left(\frac{M_h - M_s}{M_h} \right) * 100 \quad (\text{Ec. II})$$

Donde $\%H$ =Porcentaje de humedad; M_h =Peso de nuestra húmeda y M_s =Peso de la muestra seca.

4.2.7.2. Densidad aparente (g cm^{-3})

Para determinar la densidad (p) de la muestra se pesó previamente una probeta de 25 mL, a la cual se le adicionó el material hasta un volumen de 20 mL. Luego se determinó el peso del material sólo, por diferencia de pesos de la probeta sola y la probeta con material. La densidad se determinó aplicando la [Ecuación III](#) [47]. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$p = \frac{Ps}{Vb} \quad (\text{Ec. III})$$

Donde p =Densidad; Ps =Peso del material sólo; Vb =Volumen de la probeta.

4.2.7.3. Volumen de saturación

Se pesaron 3 gramos de material y se colocaron en un embudo con papel filtro. A continuación, se pasaron 150 mL de agua y se recolectó el agua saliente por la parte inferior del embudo teniendo en cuenta el volumen. El VS se calculó empleando la [Ecuación IV](#). Las determinaciones se realizaron por triplicado [3,11].

$$VS = 150 \text{ mL} - \text{Var} \quad (\text{Ec. IV})$$

Donde VS =Volumen de saturación y Var =Volumen de agua recolectada en mL.

4.2.7.4. Porosidad en porcentaje (%)

Se colocaron 3,18 g de material en una probeta de 25 mL, posteriormente se adicionó agua con una pipeta, midiendo el volumen empleado (mL) para cubrir completamente el material. El porcentaje de porosidad se determinó con la [Ecuación V](#). La determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio, con su respectiva desviación estándar [3,11,70].

$$\% Po = (Va * Vs) * 100 \quad (\text{Ec. V})$$

Donde $\% Po$ =Porcentaje de porosidad; Va =Volumen de agua empleado; Vs =Volumen del material.

4.2.7.5. pH

Se pesaron 3 g de material y se colocaron en un vaso de precipitado de 15 mL con agua destilada para tener una relación 1:5 de la mezcla. Después se agitó en shaker a 150 rpm, temperatura ambiente durante 10 minutos. Se dejó en reposo 20 min y posteriormente la mezcla se filtró a través de filtro Whatman No 3 y se midió el pH en el sobrenadante obtenido que adicionalmente sirvió para medir conductividad. Las mediciones se realizaron por triplicado [46].

4.2.7.6. Análisis próximo

Para realizar el análisis próximo se hizo primero VC, luego cenizas y por último se calculó el CF. Empleando la misma muestra y residuos que fueron quedando en cada determinación.

4.2.7.7. Carbono volátil en porcentaje (VC)

Esta determinación se realizó por el método gravimétrico. Para ello se pesó un crisol vacío y se adicionaron 4 g de muestra previamente secada a 155 °C durante 10 ± 5 minutos o hasta obtener peso constante. A continuación, se introdujo el material en la mufla (Labtech™) ajustada a una temperatura de 950 °C. Una vez se alcanzó la temperatura se contabilizaron 5 minutos, que corresponden al tiempo en el que ocurre el proceso de volatilización. Se dejó enfriar el residuo y se determinó el peso final. El cálculo de VC se realizó aplicando la Ecuación VI. Las determinaciones se realizaron por triplicado [32,50].

$$\% VC = \left(\frac{B - C}{B} \right) * 100 \quad (\text{Ec. VI})$$

Donde % VC=Porcentaje de la fracción volátil o carbono volátil. B=Peso de la muestra seca inicial (155 °C) y C=Peso de las muestras después del proceso térmico a 950 °C por 5 minutos.

4.2.7.8. Carbono fijo en porcentaje (CF)

Para determinar el carbono fijo se hace una sumatoria del porcentaje de la fracción volátil más el porcentaje de las cenizas. Posteriormente a 100 % se le resta ese resultado [32,50].

4.2.7.9. Cenizas en porcentaje

Esta técnica se realizó por el método gravimétrico. Para ello se pesó una capsula de porcelana vacía y se adicionaron 1 o 4 g de muestra proveniente de la determinación de VC. A continuación, se introdujo la capsula con la muestra en la mufla Labtech™ de 20 L y se realizó calcinación a 650 °C durante 4 horas tras las cuales se obtuvieron las cenizas. Se dejó enfriar y se determinó el peso final de las cenizas. El cálculo de cenizas se realizó aplicando la Ecuación VII, se analizaron 3 réplicas y los resultados se expresaron como el promedio, con su respectiva desviación estándar [32,50].

$$\text{Cenizas (\%)} = \left(\frac{D}{B} \right) * 100 \quad (\text{Ec. VII})$$

Donde % Cenizas=Porcentaje de cenizas; D=Peso del residuo (g) después de calcinar 650° C por 4 h y B=Peso de muestra secada a 155° C por 2 h (este dato se obtiene al realizar el análisis de VC), [32,50].

4.2.7.10. Carbono orgánico total por ignición (COT)

Se colocó 1 g de material en una cápsula de porcelana previamente pesada. Posteriormente se realizó la ignición a 400 °C en una mufla del 20 L Labtech™ durante 3 h. El crisol con la muestra se dejó enfriar y se determinó el peso final. El contenido de materia orgánica total (MOT) se determinó aplicando la Ecuación VIII [36,50].

$$\% \text{ MOT} = ((A - B) * 100) \quad (\text{Ec. VIII})$$

Donde % MOT=% Materia orgánica total; A=Peso inicial de la muestra seca y antes de la ignición; B=Peso final después de la ignición a 400 °C por 3 horas. A partir del resultado de % MOT se despeja el contenido de carbono orgánico total (COT) que se obtiene de la división de la MOT en 1,724 que es un factor de conversión como se muestra en la Ecuación IX [32,36].

$$\text{COT} = \frac{\% \text{ MOT}}{1,724} \quad (\text{Ec. IX})$$

4.2.7.11. Rendimiento en biochar y CF

Para determinar el rendimiento en BC (cantidad de BC obtenido a partir del aserrín crudo) bajo las condiciones de producción evaluadas se utiliza la [Ecuación X](#) y para calcular el rendimiento en carbono fijo se utiliza la [Ecuación XI](#) [54].

$$Y_{BC}(\%) = \left(\frac{M2}{M1} \right) * 100 \quad (\text{Ec. X})$$

Donde: Y_{BC} es rendimiento en biochar. M2 es peso seco del biochar al finalizar el tratamiento térmico. M1 es peso inicial del aserrín crudo y seco. [Ecuación X](#).

$$Y_{CF}(\%) = \frac{(Y_{BC} * CF)}{(100 - \% \text{ cenizas en aserrín})} \quad (\text{Ec. XI})$$

Donde: Y_{CF} es rendimiento en carbono fijo. Y_{biochar} es rendimiento en biochar. CF es carbono fijo (%). % cenizas es porcentaje de cenizas en el aserrín crudo. [Ecuación XI](#) [54].

4.3. Resultados

4.3.1. Caracterización inicial del APC

El aserrín de pino caribe (APC) proviene de la etapa de aserrado de las tablas de madera que han pasado por descortezado mecánico, tiene diferente tamaño de partícula y morfología. En la **Tabla 4.3.** se presentan los resultados de la caracterización química del aserrín crudo como material de partida para producción de BC. En relación con el porcentaje de humedad el valor fue bajo ($7,0 \pm 0,3$) si se compara con otro tipo de biomásas lignocelulósicas; esto se debe principalmente al contenido de lignina (40,9 %), celulosa (39 %) y hemicelulosa (15 %), polímeros complejos e hidrofóbicos. Con respecto a la densidad, volumen de saturación, porosidad y tamaño de partícula los resultados obtenidos fueron: $0,22 \pm 0,09 \text{ g cm}^{-3}$, $16,7 \pm 3,5 \text{ mL}$, $57,5 \pm 5,8 \%$ y $5,0 \pm 1 \text{ mm}$.

Los resultados del análisis químico **Tabla 4.3.** permitieron evidenciar que el APC tiene un pH ácido ($3,7 \pm 0,08$) el cual está determinado por la presencia de las subunidades de fenilpropano, sustancias extractables del aserrín, como taninos, fenoles, calconas y estilbenos. La conductividad eléctrica fue $0,53 \text{ dS m}^{-1}$, valor similar a los obtenidos en estudios previos realizados por [Pedroza & Díaz, \(2013\) \[13\]](#). La presencia de lignina, celulosa, hemicelulosa y otros compuestos extractables no determinados, determinó que la relación C/N sea alta (134/1). Siendo un valor similar a los reportado para aserrines obtenidos a partir de árboles maderables [\[3,11\]](#).

En relación con los elementos es factible que el APC tuviera cierta cantidad de ellos pues adicional a la lignina, celulosa y hemicelulosa, presentes en su estructura, también posee una pequeña fracción mineral asociada con la composición química de la pared secundaria del pino. Por otro lado, el subproducto agroindustrial al producirlo durante el proceso de aserrado cae al suelo y entra en contacto con algunos elementos que quedan retenidos la superficie del APC aportando nutrientes y micronutrientes al material (**Tabla 4.3**).

Tabla 4.3. Caracterización química y elemental del aserrín de pino caribe (APC)

Parámetro	Resultado	Unidades	Método
Análisis Físicos			
Humedad	7,0 ± 0,31	(%)	[3,11,46]
Densidad aparente	0,22 ± 0,09	g cm ⁻³	[47]
Volumen de saturación	16,7 ± 3,5	mL	[3,11]
Porosidad	57,5 ± 5,8	(%)	[3,11,70]
Tamaño de partícula	5,0 ± 1	mm	[3,11]
Análisis químico			
pH	3,7 ± 0,08		
Conductividad Eléctrica	0,53	dS m ⁻¹	Potenciométrico
C	32,1	%	Walkley-Black [46]
N	0,24	%	Sumatoria
C/N	134	NA	Calculo
Lignina	40,9	%	
Celulosa	39	%	
Hemicelulosa	15	%	
Elementos			
Potasio (K ⁺)	0,04	%	Absorción atómica [46]
Calcio (Ca ²⁺)	0,14	%	Absorción atómica [46]
Magnesio (Mg ²⁺)	0,03	%	Absorción atómica [46]
Sodio (Na ⁺)	0,029	%	Emisión de llama [46]
Fósforo Total (P ₂ O ₅)	0,06	%	Colorimétrico [46]
Sulfatos (S-SO ₄ ⁼)	0,01		Turbidimétrico [46]
Boro (B)	34	mg Kg ⁻¹	Colorimétrico [46]
Hierro (Fe)	0,002	%	Absorción atómica [46]
Manganeso (Mn)	10	mg Kg ⁻¹	Absorción atómica [46]
Cobre (Cu)	5,5	mg Kg ⁻¹	Absorción atómica [46]
Zinc (Zn)	122	mg Kg ⁻¹	Absorción atómica [46]

*Chacón (2019) [71], Quintero (2019), AGRILAB (2017).

NA: No aplica

4.3.2. Diseño factorial 2³ para la selección de las condiciones de producción de biochar

Una vez se finalizó con la producción de los ocho tipos de BC se tomaron fotografías para observar el aspecto general de los mismos: Como se observa en la **Fig. 4.4** se obtuvieron diferentes biocarbones polidispersos (diferentes tamaños) y polimórficos (diferentes formas). Predominan formar alargadas, delgadas y algunos agregados de menor tamaño. Son de color oscuro (proceso de carbonización), tienen una textura suave, se disgregan con facilidad y son de menor tamaño que el aserrín de pino inicial. Lo que se relacionaría con el efecto del tratamiento térmico ya sea a 300 °C o 500 °C, por un período de una o tres horas.

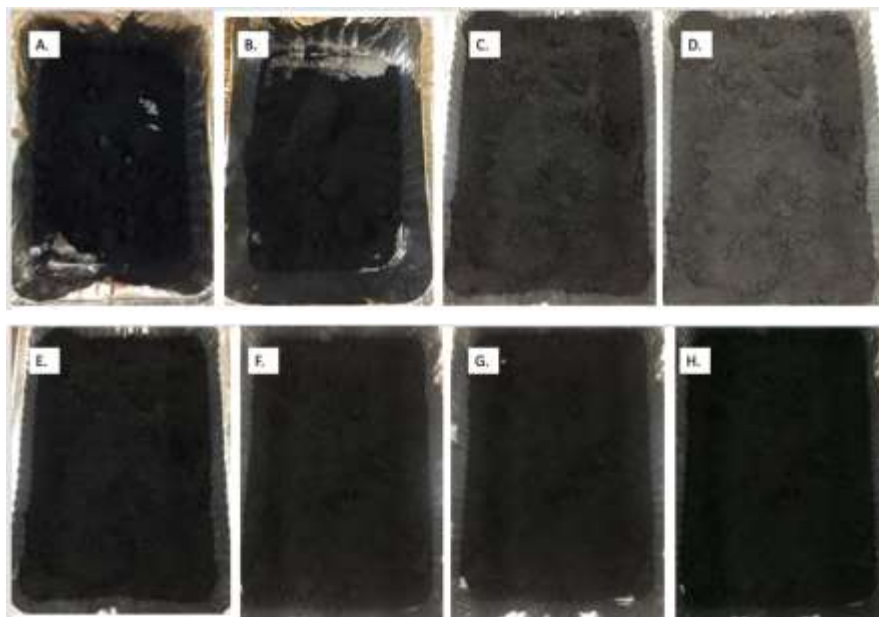


Figura 4.4. Aspecto macroscópico de los BC T1-T8 obtenidos en el diseño factorial 2^3 . **(A)** Tratamiento T1. **(B)** Tratamiento T2. **(C)** Tratamiento T3. **(D)** Tratamiento T4. **(E)** Tratamiento T5. **(F)** Tratamiento T6. **(G)** Tratamiento T7. **(H)** Tratamiento T8.

De acuerdo con el análisis de varianza para la variable de respuesta carbono fijo en porcentaje, se observa en el diagrama de Pareto que los factores con efecto positivo sobre esta variable fueron A(temperatura), interacción BC (temperatura*tiempo) e interacción ABC (temperatura*tiempo*inyección de N_2) (las barras están por encima del límite del valor de t) **(Fig. 4.5)**. El R^2 para este modelo fue de 0,9999, con un valor de $p=0,0002$ y precisión adecuada de 40,3. Para los factores más significativos ($p<0,05$) se obtuvieron valores de: $p<0,0001$ (factor A), $p<0,0001$ (interacción BC) y $p=0,0004$ (interacción ABC), y porcentajes de contribución de 83,6, 6,82 y 1,41 respectivamente **(Tabla 4.4)**.

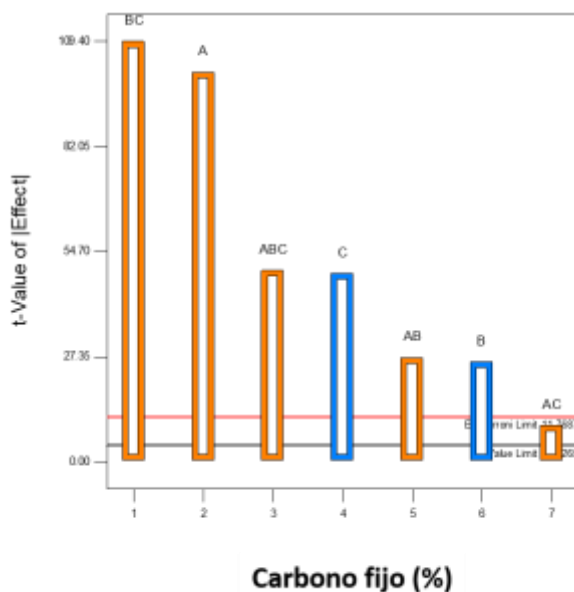


Figura 4.5. Diagrama de Pareto asociado a la variable de respuesta carbono fijo expresado como porcentaje (%).

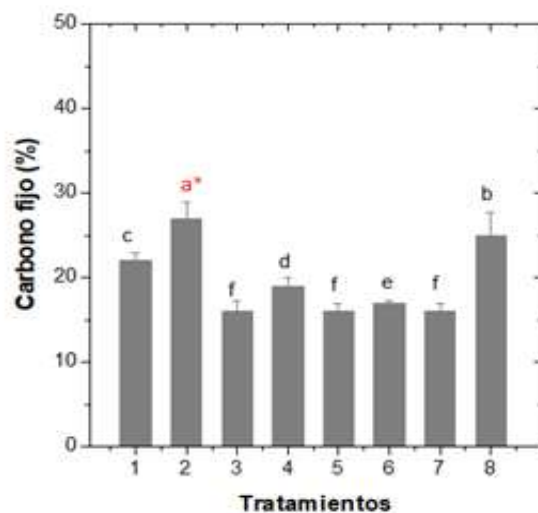
Tabla 4.4. Diseño factorial 2³ con puntos centrales. Análisis de varianza y coeficientes de regresión para carbono fijo en porcentaje

Factor	Carbono fijo (%)		
	Valor de p	Contribución (%)	Efecto estandar
Model	0,0002		+19,91
A: Temperatura	< 0,0001*	83,6	+2,54
B: Tiempo	0,0015	0,38	-0,65
C: Inyección N ₂	0,0004	1,37	-1,23
AB	0,0014	0,42	+0,68
AC	0,0108	0,051	+0,24
BC	< 0,0001*	6,82	+2,74
ABC	0,0004	1,41	-1,25
Curvatura	0,0501		
R-Squared	0,9999		
Adj R-Squared	0,9997		
CV	0,47		
Adeq Precision	40,3		

En **negrilla**: modelo y factores significativos ($p < 0,05$)

En la Fig. 4.6 se observan los resultados de carbono fijo (%) en función de los 8 tratamientos evaluados. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$) siendo el T2 y T8 los que presentaron los porcentajes más altos con $27 \pm 3\%$ y $25 \pm 2\%$ respectivamente. En el siguiente grupo heterogéneo se agruparon a los tratamientos T1, T4 y T6, en los cuales se obtuvieron porcentajes de carbono fijo (CF) que oscilaron entre 17 y 19%. En el tercer grupo se encuentran los tratamientos T3, T5 y T7, con porcentajes inferiores al 16%. El rendimiento en BC (Y_{biochar}) más alto se presentó para T2 con $21 \pm 2\%$ ($p < 0,0001$), seguido por los

tratamientos T3, T1, T4, y T7 con valores entre 18 y 19 % ($p < 0,0001$). En los tratamientos T5, T6, T8 el Y_{biochar} osciló entre 15 y 16 %. En la **Fig. 4.6**, adicionalmente se muestra el contenido de cenizas y fracción volátil (VC) para los tratamientos 2 y 8.



Tratamiento	COT (%)	CF (%)	VC (%)	Cenizas (%)	Y_{BC}
T2	52 ± 2	27 ± 3^a	$70,1 \pm 1,2$	$2,4 \pm 0,6$	21 ± 2^a
T8	56 ± 2	25 ± 2^b	$68,4 \pm 3,0$	$6,6 \pm 0,9$	$16,1 \pm 1^b$

Figura 4.6. Variables de respuesta para los tratamientos T1 y T8. Promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar. Las letras en las barras de la figura y en la tabla indican diferencias significativas entre tratamientos.

Después de analizar los resultados para carbono fijo (CF) se seleccionaron para continuar con el estudio los tratamientos T2 y T8. En base a esta información se determinó que el BC T2 combina las condiciones de producción que más favorecen el porcentaje de carbono fijo y rendimiento en BC más elevados (**Fig. 4.6**). Con respecto al contenido de carbono orgánico total (COT) del BC T2 y T8 (52 ± 2 y 56 ± 2 % respectivamente) estos se encuentran dentro del rango para ser considerados un BC tipo II según lo determinado por la [International Biochar Initiative \(2012\)](#), ya que el porcentaje es mayor al 30 % e inferior al 60 % [23]. El T8 también se seleccionó por tener un porcentaje de carbono fijo cercano al de T2, aunque fueron estadísticamente diferentes.

Finalmente, los dos tipos de BC que se usaron para los ensayos posteriores se producen bajo las siguientes condiciones; primero se realiza una reducción del oxígeno en campana de anaerobiosis por 12 horas con un sobre de anaerogen, este es un sistema generador de atmósfera anaeróbica que contiene como componente activo ácido ascórbico. La reacción del ácido ascórbico con el

oxígeno es exotérmica y alcanza una temperatura de 65 °C. El BC tipo T2 se produce por un tratamiento térmico de 500 °C por una hora sin inyección de N₂. Mientras al BC tipo T8 se produce a 500 °C por 3 horas y pulsos de N₂ cada media hora a razón de 150 mL min⁻¹.

4.3.3. Estudios complementarios de caracterización de APC y biochar T2 y T8

Para verificar si la metodología de producción de los dos tipos de BC era reproducible con respecto a los resultados obtenidos en el diseño experimental, se produjeron dos lotes nuevos y se compararon nuevamente con el aserrín crudo o sin tratamiento térmico. El APC, el porcentaje de humedad fue del $7,0 \pm 0,31$ %, con una densidad de aparente de $0,22 \pm 0,09$ g cm⁻³, porosidad del $57,5 \pm 5,8$ % y un tamaño de partícula tamizado de $5,0 \pm 1$ mm. En relación con las variables de tipo químico el pH de fue de $3,7 \pm 0,08$, conductividad eléctrica $0,53 \pm 0,02$ dS cm⁻¹, Nitrógeno total 0,0239 % y relación C/N 134 (Tabla 4.3 y 4.5).

Para el BC T2 producido a 500 ± 5 °C por 1 hora sin inyección de N₂ y BC T8 producido a 500 ± 5 °C por 3 horas y con inyección de N₂, se obtuvo un material de menor tamaño que el APC; en cuanto a la morfología macroscópica se observaron astillas pequeñas, alargadas, delgadas y de color negro, generadas por efecto del proceso de carbonización. El porcentaje de humedad disminuyó con respecto al APC obteniendo $3,6 \pm 0,51$ % para T2 y $2,7 \pm 0,5$ para T8. Este último presentó menor humedad debido al tiempo de residencia en la mufla que fue de dos horas más con respecto a T2, lo que permitió una mayor deshidratación del material. También se observó un incremento en la densidad ($0,43 \pm 0,51$ y $0,38 \pm 0,1$ g cm⁻³) y el porcentaje de porosidad (67 ± 1 y $82 \pm 0,83$ %) para BC T2 y T8. El tamaño de partícula disminuyó casi a la mitad en los dos casos por el efecto del tratamiento térmico y la compactación de la fracción de carbono resistente a la temperatura ($3,0 \pm 0,7$ y $3,0 \pm 0,4$ mm). Se observó un incremento de 3,4 unidades en el pH para obtener un valor de $7,1 \pm 0,6$ (T2) y $7,1 \pm 0,9$ (T8) (Tabla 4.5).

En relación con el análisis próximo, el carbono orgánico total (COT) disminuyó ligeramente al producir el BC T2 a 500 °C por 1 hora ($50,9 \pm 2,2$ %), si se compara con el APC ($57,9 \pm 0,15$ %), obteniendo un rendimiento en BC del $19 \pm 0,7$ %. En relación con la clasificación del tipo de BC obtenido, los resultados indican que puede ser clasificado como BC tipo II (>30 % y menor al 60 %) [23]. El carbono fijo (CF) fue del 26 ± 2 %, el carbono volátil $71,6 \pm 2,4$ % y el contenido de cenizas del $2,4 \pm 0,9$ % (Tabla 4.5).

Para el BC T8 (500 °C por 3 horas y pulsos de N₂ cada media hora a razón de 150 mL min⁻¹). Los resultados de similares a los obtenidos con el BC T2, solamente observaron diferencias marcadas en el porcentaje de humedad ($2,7 \pm 0,5$ %), porcentaje de porosidad ($82 \pm 0,83$ %), carbono fijo (24,6 %) y rendimiento en BC ($17,1 \pm 0,9$ %), (Tabla 4.5). Nuevamente se confirmó que al producir el BC T8 los porcentajes de carbono fijo y rendimiento en BC son más bajos que los obtenidos con el BC T2. Por esta razón, se tomó la decisión de continuar trabajando con el BC T2 debido a que se puede producir en una hora de tratamiento térmico y no se requiere la inyección de pulsos de N₂, con sólo colocar en aserrín en campana de anaerobiosis y desplazarlo con el catalizador por 12 horas se puede reducir la tensión de oxígeno para trabajar bajo condiciones reducidas de oxígeno. Esto disminuye los costos de producción del BC, porque la inyección continua de N₂ para mantener condiciones libres de oxígeno puede ser costoso y el reactor de pirólisis debería tener una adaptación especial para mantener estas condiciones de atmósfera controlada.

Tabla 4.5. Caracterización complementaria de aserrín de pino caribe (APC), BC T2 y BC T8

Parámetros	APC	BC T2	BC T8
Caracterización general			
Humedad (%)	$7,0 \pm 0,31$	$3,6 \pm 0,51$	$2,7 \pm 0,5$
Densidad (g cm ⁻³)	$0,22 \pm 0,09$	$0,43 \pm 0,51$	$0,38 \pm 0,1$
Volumen de saturación (mL)	$16,7 \pm 3,5$	$7,0 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,05$
Porosidad (%)	$57,5 \pm 5,8$	67 ± 1	$82 \pm 0,83$
Tamaño de partícula (mm)	$5,0 \pm 1,0$	$3,0 \pm 0,7$	$3,0 \pm 0,4$
pH	$3,7 \pm 0,8$	$7,1 \pm 0,6$	$7,1 \pm 0,9$
Análisis próximo (wt.%, wet basis)			
COT (%)	$57,9 \pm 0,15$	$50,9 \pm 2,2$	48,02
CF (%)	$14,15 \pm 0,21$	26 ± 2	24,6
VC (%)	$80,68 \pm 0,31$	$71,6 \pm 2,4$	69
Cenizas (%)	$5,17 \pm 0,37$	$2,4 \pm 0,9$	6,4
Rendimiento en BC	NA	$19 \pm 0,7$	$17,1 \pm 0,9$

4.3.4. Estudios específicos de caracterización de APC y BC T2

El análisis elemental y grado de polimerización se le realizaron al APC y al BC T2 recién producido; ya que este fue el BC seleccionado para formar parte del biofertilizante al emplearlo para inmovilizar las BPS como se presenta en los resultados asociados con esta sección de la metodología. En la Tabla 4.6. se presenten los resultados del análisis elemental, se observó un incremento en el Carbono en el BC (71,05 %) con respecto al APC (48,2 %). El contenido de oxígeno disminuyó en el BC tras el proceso térmico (26,9 %). Por el contrario, el contenido de H (%) disminuyó en el BC (1,74 %) con respecto al APC (5,89 %). Con respecto a las relaciones

atómicas H/C y O/C, se observó una disminución en el BC (0,02 y 0,38 para H/O y O/C) en comparación con el APC (0,12 y 0,95 para H/O y O/C). Estos resultados sugieren la pérdida de húmedas, compuestos alifáticos, pérdida de compuestos volátiles y generación de un material estable, condensado y menos polar que el aserrín de pino (Tabla 4.6).

El grado de polimerización o condensación semicuantitativa E_4/E_6 en la primera fracción o sobrenadante de la extracción alcalina (S/E_{Alk}) para el APC de $9,9 \pm 0,5$, indicando que se extrajeron sustancias solubles a pH alcalino con diferentes grados de aromaticidad y sustancias alifáticas, propias del aserrín como biomasa lignocelulósica sin transformar. Para el BC el valor disminuyó a $2,45 \pm 0,5$ y se relacionó como el proceso térmico que sustrajo parte de la fracción alifática en forma de compuestos volátiles y tiende a concentrar las fracciones de carbono altamente condensadas (complejos aromáticos modificados por la temperatura).

En la extracción ácida del APC, asociada con el sobrenadante (S/E_{Ac}) el valor de la relación incremento a $17,7 \pm 0,9$ indicando que en esta fracción se recuperaron los compuestos alifáticos y aromáticos con menor grado de aromaticidad [48]. Que para muchos autores se relacionan con ácidos fúlvicos, pero para este caso en particular no se hablaría de este tipo de compuestos dado que el APC no ha pasado por ningún proceso de humificación directa o indirecta que favorezca la producción de estos ácidos. Sin embargo, los compuestos que podrían estar en esta fracción serían algunas de las subunidades de alcohol cumarílico y coniferílico, que tienen menor grado de metilación [72,73]. Para el BC una disminución ($1,8 \pm 0,5$), la cual podría estar relacionada con las disminución y cambio de las sub unidades de fenil propano.

En el análisis del sedimento de la extracción ácida (SD/E_{Ac}) se obtuvieron los valores más bajos para el APC y el BC ($5,4 \pm 0,7$ y $1,3 \pm 0,6$). Lo cual podría relacionarse con la presencia de las subunidades de alcohol sinapílico que son las más estables del APC y compuestos de carbono altamente condensados y carbonizados en el BC.

Tabla 4.6. Análisis elemental, relaciones atómicas y relaciones de aromaticidad para el APC y BC T2

Parámetros	APC	BC T2
C (%)	48,16	71,05
O (%)	45,87	26,9
H (%)	5,89	1,74
N (%)	0,08	0,32
Relación H/C	0,12	0,02
Relación O/C	0,952	0,378
(O+N)/C	0,973	0,383
Relación E ₄ /E ₆ para S/E _{Alk}	9,9 ± 0,5	2,45 ± 0,5
Relación E ₄ /E ₆ para S/E _{Ac}	17,7 ± 0,9	1,8 ± 0,5
Relación E ₄ /E ₆ para SD/E _{Ac}	5,4 ± 0,7	1,3 ± 0,6

4.3.5. Espectroscopía de infrarrojo con arreglos de Fourier

La información obtenida a partir del análisis IR, indica que el aserrín de pino caribe (APC) y el BC presentan características orgánicas, evidenciándose en cada una de las muestras la presencia de bandas de vibración asociadas a grupos funcionales orgánicos. Se destaca el grupo carbonilo (C=O) con banda de 1740 cm⁻¹ presente en todas las muestras. En el APC (línea azul) se observaron señales bien definidas a 1025 cm⁻¹, 1585 cm⁻¹ y 1740 cm⁻¹, que corresponden a enlaces simétricos sencillos C-O, enlaces dobles C=C y enlaces dobles C=O. Adicionalmente, a 3330 cm⁻¹ se formó una banda ancha asociada con enlaces H-O-H. En el BC (línea roja) las señales asociadas con enlaces sencillos C-O (1025 cm⁻¹) y enlaces H-O-H (3330 cm⁻¹) desaparecieron al realizar el tratamiento térmico a 500 °C por 1 h. También, el tratamiento térmico ayudó a ampliar y/o definir algunas señales que estaban en el APC. Se destacan las bandas relacionadas con enlaces C=C (1585 cm⁻¹) y enlaces dobles C=O (1740 cm⁻¹). Por otro lado, el tratamiento térmico favoreció la formación de nuevas bandas que no estaban presentes en el APC, entre las que se destacan la señal a 1365 cm⁻¹ que corresponde a enlaces C-C y a 2960 cm⁻¹ se trata de formar una banda relacionada con enlaces C-H (**Fig. 4.7**).

Al realizar la coinoculación de las PBS al biochar (BC/BPS) (línea negra), nuevamente se observaron cambios en los espectros de FTIR. Las señales a 1025 cm⁻¹ (enlaces C-O) y 3330 cm⁻¹ (enlaces O-H) que había desaparecido en BC, vuelve a observarse en el BC/BPS. Las señales a 1365 cm⁻¹ (enlaces C-C), 1740 cm⁻¹ (enlaces C=O) y 2960 cm⁻¹ (enlaces C-H) fueron similares al BC sin coinocular. Finalmente, en el BC/BPS se observó que la señal a 1585 cm⁻¹ desaparece al coinocular las BPS. Estos resultados sugieren que el tratamiento térmico de 500 °C por 1 hora genera mayor cantidad de cambios en los grupos funcionales de la superficie del BC que la coinoculación con las BPS (**Fig. 4.7**).

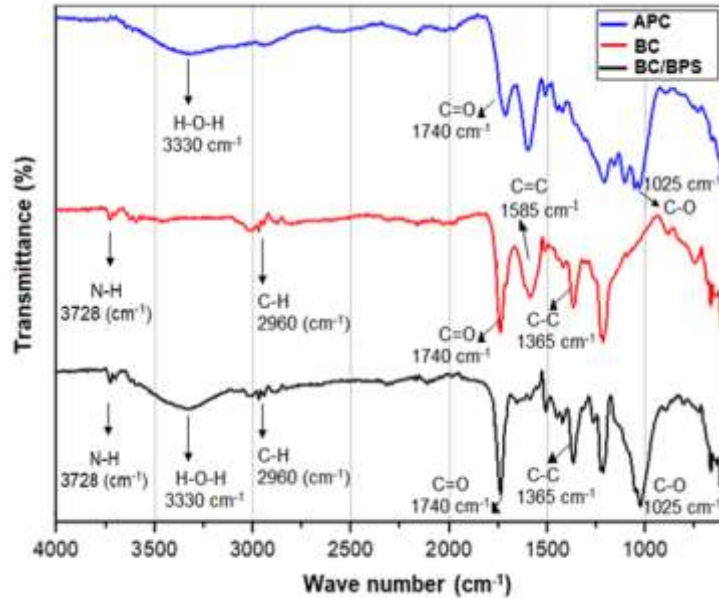


Figura 4.7. Espectros IR de las muestras analizadas: aserrín de pino caribe (APC), biochar (BC) y biofertilizante (BC/BPS).

4.3.6. Microscopía electrónica de barrido para APC y BC

Al observar el aserrín de pino a bajo aumento (150x) se determinó que tiene una superficie y forma irregular, con cavidades de diferente tamaño e inferiores a 100 μm . Lo que es generado por el proceso de aserrado mecánico. A mayor aumento (17.000x) se observó que la superficie es más homogénea, presenta capas y es porosa (**Fig. 4.8A y B**). En relación al biochar (BC) a 150x se observaron fragmentos polimórficos y polidispersos, predominando las formas alargadas y delgadas que no se observaron en el APC inicial (**Fig. 4.8C**). Al realizar al tratamiento térmico a 500 °C por 1 h la superficie del BC se volvió más lisa que el APC, se formaron mayor cantidad de poros de diferente tamaño y con bordes más definidos. Los cuales se pudieron producir por el desplazamiento del agua, compuestos volátiles y el oxígeno a 500 °C (**Fig. 4.8D**).

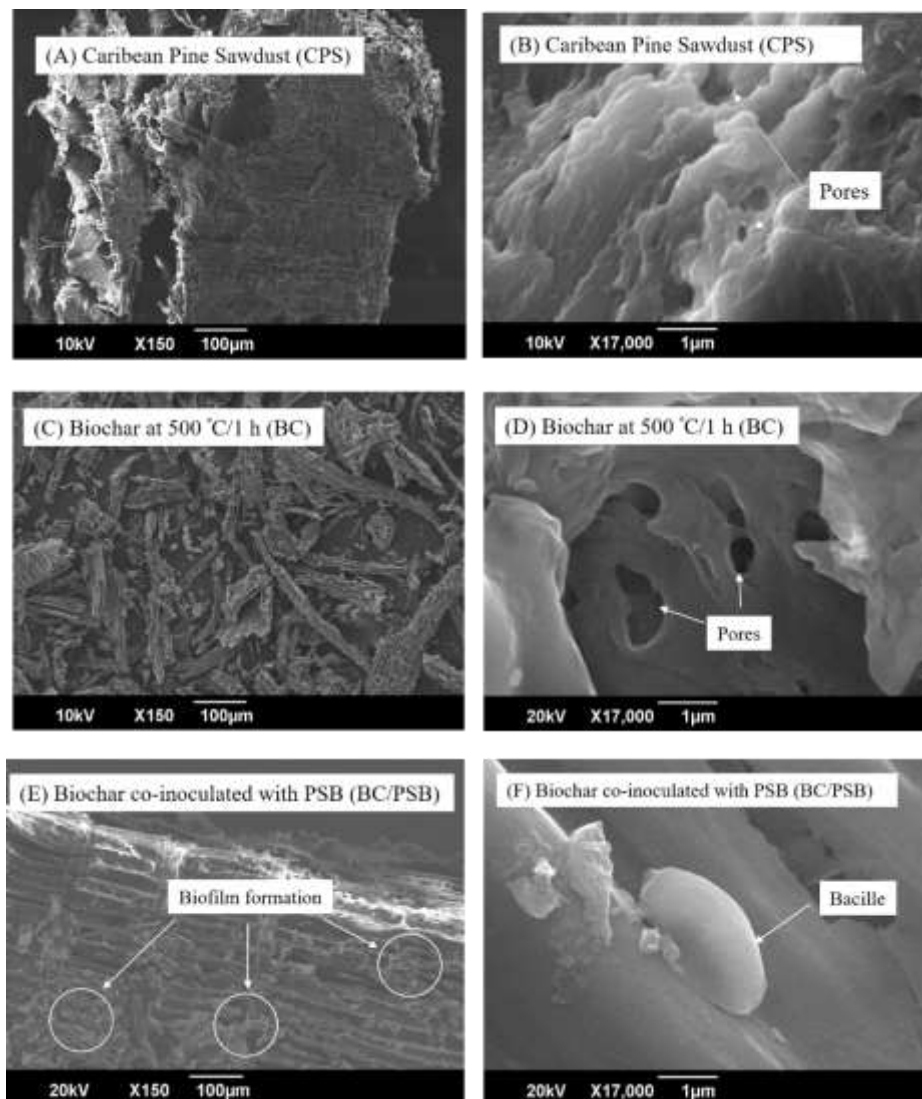


Figura 4.8. Características morfológicas del material. **(A)** MEB a 150x de aserrín de pino caribe (APC). **(B)** MEB a 17000x de aserrín de pino caribe (APC). **(C)** Biochar (BC) a 500 °C / 1 h, MEB a 150x **(D)** Biochar (BC) a 500 °C / 1 h, MEB a 17000x. **(E)** Biochar co inoculado con BPS (BC/BPS), MEB a 150x. **(F)** Biochar co inoculado con BPS (BC/BPS), MEB a 150x.

4.3.7. Estudios de adsorción para las bacterias fosfato solubilizadoras

La temperatura de pirólisis afecta las propiedades químicas del BC si se compara con el APC, el cual tenía un pH ácido ($3,7 \pm 0,8$). Al realizar el tratamiento térmico a 500 °C por 1 hora el pH incremento ($7,1 \pm 0,6$) y al determinar el punto de carga cero el valor obtenido fue de $4,1 \pm 0,8$ (Fig. 4.9). Este resultado indica que el BC sin BPS está cargado negativamente ($\text{pH de } 7,0 \pm 0,2 > \text{pH}_{zpc}$). Bajo estas condiciones se pueden dar interacciones diferentes entre el BC y los adsorbatos (bacterias y ortofosfatos), las cuales dependerán de varios factores como el pH de la solución, el tiempo de contacto y la concentración inicial del adsorbente y adsorbatos [65]. Esto

se comprobó al realizar los estudios de adsorción para las bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) que se presentan a continuación.

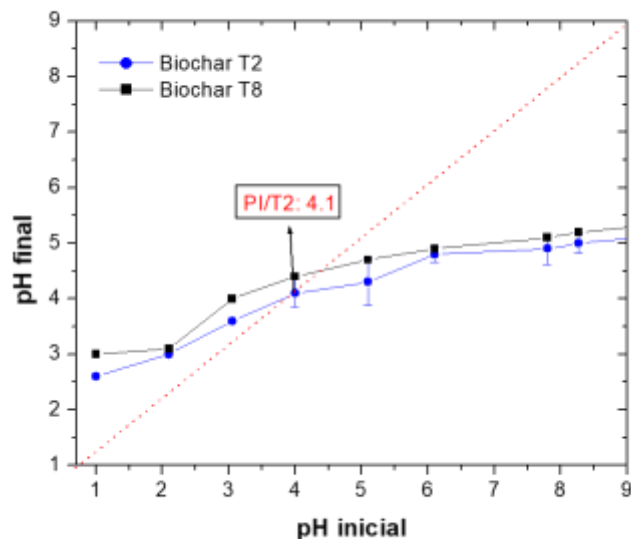


Figura 4.9. Determinación de punto isoeléctrico para BC T2.

En relación con los estudios de adsorción con las BPS a tres pH, se observó que las bacterias se adsorbieron rápidamente desde los primeros minutos de contacto y alcanzaron el equilibrio de adsorción/desorción entre los 20 ± 10 minutos, para pH de $3,0$ y $5,0 \pm 0,2$. A pH de $8,0 \pm 0,2$ se necesita mayor tiempo de contacto para alcanzar el equilibrio (40-60 minutos). En relación con el efecto del pH, se evidenciaron diferencias entre pH, determinando que a pH de $3,0 \pm 0,2$ se favoreció la mayor adsorción de las bacterias al BC, obtenido un valor de q_e iguales a $0,141 \text{ Log}_{10} \text{ BPS g}^{-1} \text{ BC}$. A pH de $5,0 \pm 0,2$ el valor de q_e fue de $0,044 \text{ Log}_{10} \text{ BPS g}^{-1} \text{ BC}$ y a pH de $8,0 \pm 0,2$ se obtuvo el valor más bajo $0,019 \text{ BPS g}^{-1}$ (**Fig. 4.10A**).

Al analizar los resultados experimentales se obtuvo que el modelo que mejor describe el proceso de adsorción de las BPS al BC fue el modelo de pseudo-segundo orden, obteniendo R^2 de $0,9991$, $0,9792$ y $0,8587$, para pH de $3,0$, $5,0$ y $8,0 \pm 0,2$ (**Fig. 4.10B**). Los valores de q_e calculados por los modelos fueron similares a los valores q_e experimental y de acuerdo con este modelo las constantes de adsorción para pH de $3,0$ y $5,0 \pm 0,2$, fueron más altas ($0,240$ y $0,257 \text{ g Log}_{10} \text{ UFC}^{-1} \text{ min}^{-1}$) que para pH $8,0 \pm 0,2$ ($0,055 \text{ g Log}_{10} \text{ UFC}^{-1} \text{ min}^{-1}$). En relación el pH de $8,0$ cuyo valor de R^2 fue menor que $0,9$, se podría suponer que la repulsión electrostática entre grupos

funcionales de la misma carga determinó que el valor de la constante de adsorción haya disminuido 4,4 veces más que para el pH de $3,0 \pm 0,2$ y 4,6 veces más que para pH de $5,0 \pm 0,2$ (Fig. 4.10 y Tabla 4.7).

Con el modelo *Elovich* también se obtuvieron valores elevados de R^2 en especial para pH de 3,0 y 5,0 (0,93 y 0,97). Este modelo es empleado por varios autores para describir la adsorción por interacciones químicas entre diferentes compuestos usados como adsorbentes [65,74]. Para algunos de ellos la velocidad de adsorción disminuye con el tiempo debido a la saturación del material. Bajo este concepto se podría suponer que para pH de 3,0 y $5,0 \pm 0,2$, la velocidad inicial de adsorción (α) fue mas baja que para pH $8,0 \pm 0,2$, demostrando que las células se adsorben mas rapidamente a pH ácidos que a pH alcalinos y cuando se alcanza la saturación del BC la velocidad disminuye. Con respecto al coeficiente de desorción (β) fue más alto a pH ácidos que alcalinos. Siedo el valor de β a pH de $3,0 \pm 0,2$ el más alto ($0,040 \text{ g Log}_{10} \text{ BPS}^{-1}$), lo que demostraría que una vez se presenta la saturación del BC, inicia la desorción de las bacterias, porque no estan disponibles sitios activos en el BC (Tabla 4.7).

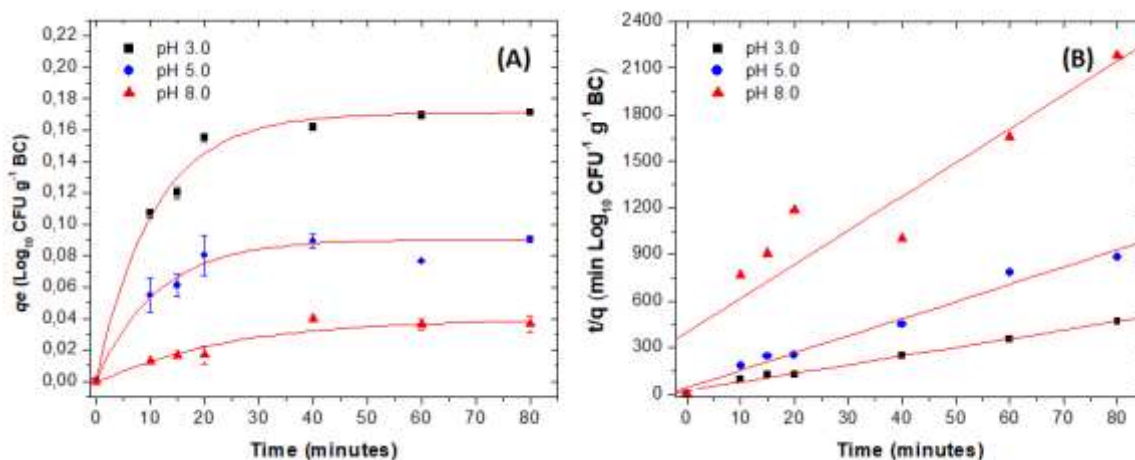


Figura 4.10. Estudios de adsorción de las BPS al BC. (A) Valor q en función del tiempo a diferentes pH para las BPS. (B) Modelo de pseudo-segundo orden para las BPS. Los resultados son el promedio de tres réplicas con su respectiva desviación.

Tabla 4.7. Parámetros de los modelos cinéticos obtenidos para los estudios de adsorción de BPS y orto fosfatos al BC

Modelación para BPS						
pH	Pseudo-segundo orden			<i>Elovich</i>		
	q_e Log ₁₀ UFC g ⁻¹	k^2 g Log ₁₀ UFC ⁻¹ min ⁻¹	R ²	α Log ₁₀ UFC g ⁻¹ min ⁻¹	β g Log ₁₀ UFC ⁻¹	R ²
3,0	0,179	0,240	0,9991	31,3	0,040	0,9381
5,0	0,090	0,256	0,9792	64,1	0,020	0,9789
8,0	0,045	0,055	0,8587	67,3	0,009	0,8501

Donde q_e es la cantidad de BPS adsorbidas en el tiempo t (BPS: Log₁₀ UFC g⁻¹), k^2 es la constante de velocidad de equilibrio de adsorción de pseudo-segundo orden (BPS: g Log₁₀ UFC⁻¹ min⁻¹), α es la tasa de adsorción inicial (BPS: Log₁₀ BPS g⁻¹ min⁻¹), β es la constante de desorción (PBS: g Log₁₀ BPS⁻¹) durante cualquier experimento.

En relación con los modelos de pseudo-primero orden, difusión intrapartícula y difusión en película, los resultados experimentales no ajustaron apropiadamente a estos modelos y no podrán explicar con claridad el fenómeno de adsorción que se está llevando a cabo. Dado que los valores de R² fueron bajos y se presente mucha dispersión en los datos experimentales, en especial en largos períodos de adsorción. Los resultados se presentan en el [Anexo 4.12.1](#).

4.3.8. Estudios de adsorción para ortofosfatos

La adsorción de ortofosfatos al BC también está influenciada por el pH de la solución. En la [Fig. 4.11 y Tabla 4.8](#), se presentan los resultados de estos experimentos. A pH de 7,0 ± 0,2 la adsorción del fósforo fue baja, pero ocurrió desde los primeros minutos de contacto obteniendo valores de q_e iguales a 0,116 mg g⁻¹ de BC ([Fig. 3A](#)). A pH de 3,0 y 5,0 ± 0,2, no se observó adsorción a las 120 horas de evaluación (datos no graficados). El modelo que mejor describió el proceso de adsorción de ortofosfatos al BC a pH de 7,0 fue el de pseudo-segundo orden obteniendo un R² de 0,9286 y 0,902 g mg P⁻¹ min⁻¹ como valor para la constante de pseudo segundo orden. A pH 3,0 y 5,0 ± 0,2 los valores de q_e experimentales fueron negativos con -0,797 mg g⁻¹ de BC y -0,793 mg g⁻¹ de BC, respectivamente. Indicando que a estos pH el BC no tiene capacidad de adsorción para los orto fosfatos ([Tabla 4.8](#)).

Con el modelo *Elovich* se obtuvieron valores de R² de 0,1601, 0,0411 y 0,7700 para pH 3,0, 5,0 y 7,0 ± 0,2 respectivamente. La ecuación de *Elovich* se usa comúnmente para determinar la cinética de la quimisorción de compuestos o elementos en sólidos heterogéneos, y es bastante restringida, ya que sólo describe una propiedad limitante finalmente alcanzada por la curva

cinética. En base a este postulado se pudo intuir que a pH 3,0 y $5,0 \pm 0,2$ no se dio el proceso de adsorción, dado que los valores de velocidad inicial (α) fueron cercanos a cero (0,00006 y -0,066 respectivamente), mientras que a pH 7,0 el valor de α fue de 3703 indicando que los ortofosfatos se adsorben mas rapidamente al BC cuando el pH del medio se encuentra cercano a la neutralidad. En relacion al coeficiente de desorción (β) se incremento a medida que incremento el pH. Siedo el valor de β a pH de $7,0 \pm 0,2$ el más alto (0,041 mg P⁻¹), lo que demostraría que a pH ácidos el proceso de adsorción es casi nulo, a diferencia de el proceso que ocurre a pH $7,0 \pm 0,2$ en donde se presentó adsorción de 2,5 mg L⁻¹ de ortofosfatos al BC a las 120 horas de evaluación (Tabla 4.8. y Fig. 4.11).

Con respecto a los modelos de pseudo-primer orden, difusión intra partícula y difusión en película, estos no aportaron información para explicar el proceso de adsorción de ortofosfatos al BC, dado que los resultados experimentales no ajustaron a estos modelos.

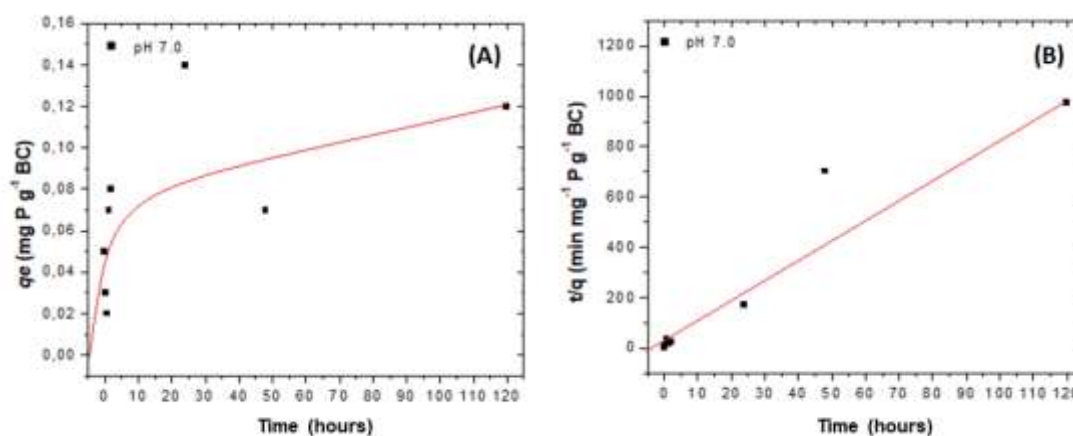


Figura 4.11. Estudios de adsorción de ortofosfatos al BC (A) Valor q en función del tiempo a pH 7,0 para iones ortofosfatos. (B) Modelo de pseudo-segundo orden para los iones ortofosfato. Los resultados son el promedio de tres réplicas con su respectiva desviación.

Tabla 4.8. Parámetros de los modelos cinéticos obtenidos para los estudios de adsorción de ortofosfatos al BC

Modelación para iones ortofosfato						
pH	Pseudo-segundo orden			Elovich		
	q_e mg de P g ⁻¹	k^2 g mg P ⁻¹ min ⁻¹	R ²	α mg P g biochar ⁻¹ min ⁻¹	β mg P ⁻¹	R ²
3,0	-0,797	0,279	0,9910	0,00006	0,009	0,1601
5,0	-0,793	3,142	0,9902	-0,066	0,021	0,0411
7,0	0,116	0,902	0,9286	3703	0,041	0,7700

Donde q_e es la cantidad de ortofosfatos adsorbidos en el tiempo t y (ortofosfatos: mg g⁻¹), k^2 es la constante de velocidad de equilibrio de adsorción de pseudo-segundo orden (ortofosfatos: g mg P⁻¹ min⁻¹), α es la tasa de adsorción inicial (mg P g biochar⁻¹ min⁻¹), β es la constante de desorción (g mg P⁻¹) durante cualquier experimento

4.3.9. Co inoculación de las BPS al BC y caracterización

Una vez se determinaron los pH en los cuales se favorece la adsorción de las BPS al BC (3,0 y 5,0) se realizó el proceso de inmovilización o co inoculación de las mismas, caracterización del BC con las bacterias y se evaluó su viabilidad de las bacterias o estabilidad por 150 días. De esta forma se garantizó que las BPS pudieran sobrevivir en el BC para llevar a cabo los estudios en materas por 4 meses que se presentan como parte del [Capítulo 5](#).

Para el experimento se produjo un nuevo lote de BC, se co inóculo con las BPS por impregnación húmeda y se realizó la reactivación secundaria por 24 h a 30 °C, obteniendo recuentos de $1,0 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^2$ BPS g⁻¹, para BPS totales. En relación con los recuentos por morfotipo los resultados fueron de $3 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^1$ BPS g⁻¹, $1,3 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^1$ BPS g⁻¹ y $2,6 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^2$ BPS g⁻¹, para *Pseudomonas* sp., *Kosakonia* sp. y *Serratia* sp. En la [Tabla 4.9](#) se presentan los resultados de la caracterización general del BC sólo y co inoculado con BPS (BC/BPS). Se observó que el porcentaje de humedad incremento (99 ± 2 %) con respecto al BC sin bacterias ($3,6 \pm 0,51$ %). La densidad ($0,42 \pm 0,1$ g cm⁻³), el porcentaje de porosidad ($64,3 \pm 1,1$ %) y el tamaño de partícula no tuvieron un cambio sustancial con respecto al BC. El pH disminuyó con respecto al BC sin bacterias, obteniendo un valor de $6,4 \pm 0,5$. Lo que podría relacionarse con la producción de ácidos orgánicos por parte de las BPS [75].

En los resultados del análisis próximo, se observó un incremento en el porcentaje de carbono orgánico total (54 ± 3 %). El cual se relacionó con la co inoculación de las BPS que por su naturaleza orgánica aportan carbono. Por esta razón, se observó una disminución en el carbono

volátil del 3,4 % (Tabla 4.9). En porcentaje de cenizas fue similar en el BC/BPS y el BC ($2,0 \pm 0,9$ %).

En relación con el análisis elemental el porcentaje atómico de carbono fue del 25,12 %, el oxígeno se incrementó del 26,9 al 73,61 %, el hidrógeno fue similar al BC sin bacterias (1,23 %) y el nitrógeno disminuyó obteniendo un valor de 0,04 %. La relación atómica H/C, fue similar para el BC sin inocular y el BC/BPS (0,02 y 0,05, respectivamente); lo que significa que la adición de las bacterias no generó cambios sustanciales relacionados con la disminución de los compuestos altamente condensados que forman el BC. Por el contrario, las relaciones atómicas O/C y (O+N)/N, aumentaron al al co inocular las BPS (2,930 y 2,931 respectivamente). Lo que sugiere que la adición de las BPS en solución acuosa incrementa la cantidad de grupos polares y la cantidad de agua intersticial (Tabla 4.9).

Otros datos experimentales que ayudaron a soportar que la co inoculación de las BPS no modifica el grado de aromaticidad y condensación del BC fueron los resultados de la extracción química empleando sustancial empleando hidróxido de potasio y ácido clorhídrico. Como se puede observar en la Tabla 4.9, los valores de S/E_{Alk}, S/E_{Ac} y SD/E_{Ac} en el BC/BPS, incrementaron ligeramente si se comparan con el BC. Pero no igualan o superan al APC inicial en el cual predominan compuestos aromáticos y alifáticos sin carbonizar, que hacen parte de los polímeros de lignina, celulosa y hemicelulosa. Estos resultados sugieren que la estructura aromática, condesada y carbonizada del BC no cambian por la adición de las BPS en solución acuosa (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Análisis próximo y elemental para el biochar producido a 500° C 1/h (BC) y proceso de co inoculación con BPS (BC/BPS)

Parámetros	Biochar T2 sin bacterias (BC)	BC co inoculado con BPS (BC/BPS)
Caracterización general		
Humedad (%)	$3,6 \pm 0,51$	99 ± 2
Densidad (g cm ⁻³)	$0,43 \pm 0,51$	$0,42 \pm 0,1$
Volumen de saturación (mL)	$7,0 \pm 0,1$	NA
Porosidad (%)	67 ± 1	$64,3 \pm 1,1$
Tamaño de partícula (mm)	$3,0 \pm 0,7$	$3,0 \pm 1$
pH	$7,1 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,5$
Análisis próximo (wt.%, wet basis)		
COT (%)	$50,9 \pm 2,2$	54 ± 3
Rendimiento en BC	$19 \pm 0,7$	NA
CF (%)	26 ± 2	23 ± 2

VC (%)	71,6 ± 2.4	75 ± 3
Cenizas (%)	2,4 ± 0.9	2 ± 0,9
Análisis elemental y grado de condensación		
C (%)	71,05	25,12
O (%)	26,9	73,61
H (%)	1,74	1,23
N (%)	0,32	0,04
Relación H/C	0,02	0,05
Relación O/C	0,38	2,93
Relación E ₄ /E ₆ para S/E _{Alk}	2,45 ± 0,5	2,6 ± 0,9
Relación E ₄ /E ₆ para S/E _{Ac}	1,8 ± 0,5	ND
Relación E ₄ /E ₆ para SD/E _{Ac}	1,3 ± 0,6	ND

ND: No determinado

4.3.10. Estudios de viabilidad de las BPS en el BC

En la [Fig. 4.12](#) se presentan los resultados de las pruebas de viabilidad y estabilidad de las BPS co inoculadas en el BC en función del tiempo (150 días a 19 ± 2 °C). Las BPS totales (concentración inicial: $1,0 \times 10^5 \pm 1 \times 10^1$ BPS g⁻¹) mantuvieron su viabilidad por 150 días sin que los recuentos disminuyeran por debajo de $1,0 \times 10^4 \pm 1 \times 10^1$ BPS g⁻¹, lo que corresponde a una estabilidad igual o superior al 80 %. El porcentaje de humedad del BC/BPS inicio en 90 ± 2 %, a los 8 días disminuyó ($67,2 \pm 2,2$ %) y este valor se mantuvo similar hasta los 150 días ($69,3 \pm 1,5$ %). Durante todo el estudio el pH osciló entre $6,4 \pm 0,5$ y $6,0 \pm 0,8$.

Por otro lado, la presencia de las BPS, su distribución sobre la superficie del BC al inicio y a los 150 días, se observó a través de microscopía electrónica de barrido. Como se puede observar en la [Fig. 4.12B](#), las BPS iniciales se distribuyeron sobre la superficie de BC y en algunas zonas se ubicaron en las grietas y poros del BC. En cuanto a la morfología predominante al inicio y final del estudio de estabilidad, se observó una sola morfología que correspondió a bacilos cortos característicos de los tres géneros bacterianos que hacen parte del consorcio de BPS y concuerda con los resultados previos publicados por [Moreno-Bayona et al., 2019](#) y [Blanco-Vargas et al., \(2020b\)](#), [32,42].

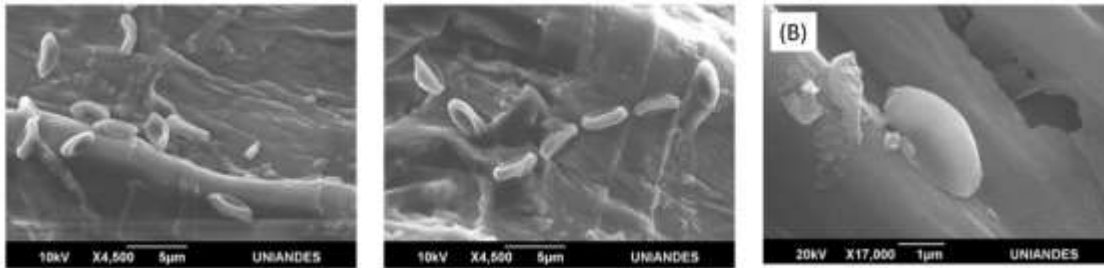
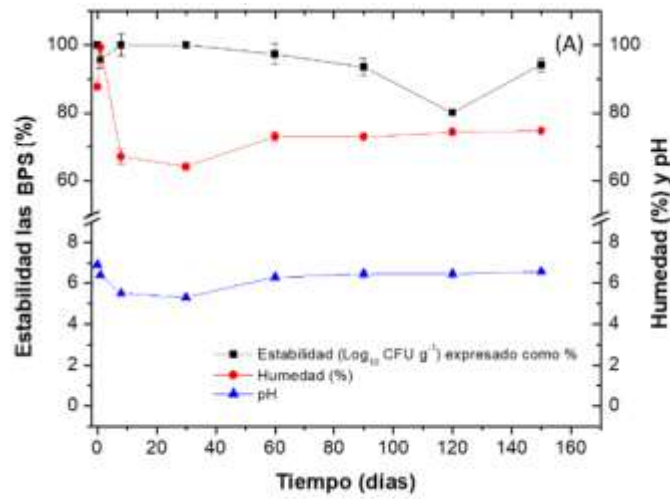


Figura 4.12. Estabilidad de las BPS en el BC en el tiempo. A) pH, humedad y estabilidad de las BPS en el BC/BPS, B) Microcopia electrónica de barrido (MEB) de las BPS adheridas en el BC T2 a 4500X y 17000x

4.4. Discusión

4.4.1. Caracterización del APC y el BC

El APC está compuesto por lignina (40,9 %), celulosa (39 %), hemicelulosa (15 %), compuestos extractables (5,1 %), nitrógeno (0,24 %), relación C/N de 134 y varios elementos como K^+ (0,04 %), Ca^{2+} (0,14 %), Mg^{2+} (10 mg Kg^{-1}), Na^+ (0,029 %), P_2O_5 (0,06 % como fósforo total), Fe total (0,002 %), Al (2,3 %), entre otros **Tabla 4.3**. Las características físicas y químicas, del APC empleado en este estudio fueron similares a las reportadas por otros autores que han producido biochar a partir de aserrín de pino y concuerdan con los elevados contenidos de polímeros estructurales [15,73]. La elevada relación C/N está determinada por la presencia de mayor cantidad de carbono orgánico de lenta degradación y bajo contenido de nitrógeno. También parte de este carbono es aportado por sub unidades de fenil propano que constituyen el polímero de lignina (alcohol *p* - coumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico). Estos monómeros se unen por enlaces éter, C-C, aril-C y tienen diferentes grupos funcionales como metoxilo, hidroxilo y carbonilo [76]. Estas características le confieren a la lignina un elevado grado de aromaticidad y características hidrofóbicas, que son determinantes en la estructura final del biochar a producir [73]. Por otro lado, la estructura amorfa, cristalina y los puentes de hidrógeno presentes en la celulosa también contribuyen a incrementar la hidrofobicidad del APC [53,72]. Es por esto que la composición química del APC dificulta la transformación por vía biológica, pero lo convierten en una excelente materia prima para la conversión térmica, obteniendo BC, bioaceites o gases combustibles. Por otro lado, la conversión térmica es otra alternativa para el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica (aserrín y corteza) producida por el sector forestal a nivel mundial [3,32,57,73,77].

Durante el proceso de pirólisis, se pudieron dar tres etapas que afectaron las propiedades físicas y químicas del BC. La primera fue la deshidratación del APC que ocurre a temperaturas entre 50-300 °C; en este rango de temperatura el APC pierde agua, inicia la descomposición térmica y ocurre una ligera concentración de componentes [55]. En la segunda etapa se produce la combustión bajo condiciones reducidas de oxígeno, en la cual se llevan a cabo procesos de volatilización de las fracciones más lábiles asociadas con el carbono, nitrógeno y azufre. Ocurre en rangos de temperatura que oscilan entre 250 °C y 350 °C. Así mismo la hemicelulosa y la celulosa sufren procesos de degradación térmica a estas temperaturas y comienzas a formarse

los núcleos de grafeno [55,57,78]. Por otro lado, la descomposición y reorganización de los subproductos de la lignina inicia a temperaturas superiores (350 °C y 450 °C), [76]. Siendo los más reportados los derivados de *p*-hidroxifenilo, guayacilo y siringilo [73]. La lignina al ser el polímero más estable y producir durante el proceso de pirólisis derivados aromáticos, es considerada como la responsable de aportar la mayor proporción de carbono que se convertirá en las estructuras condensadas del biochar [15,73]. Por último, en la tercera etapa se llevan a cabo los procesos de carbonización y condensación para generar la fracción más estable del BC, la cual se inicia a temperaturas de 400 °C hasta alcanzar los 500 °C. Por encima de esta temperatura se llevan a cabo arreglos estructurales en el biochar pero no determinan cambios sustanciales en las propiedades finales del biochar producido a partir de APC por 1 hora a 500° C [76,78,79].

Como se presenta en la **Tabla 4.9**, el porcentaje de humedad del BC disminuyó en BC ($3,6 \pm 0,51$ %) por el proceso de deshidratación del APC ($7,0 \pm 0,31$ %) (**Tabla 4.3**). Los incrementos en la densidad ($0,42 \pm 0,1$ g cm⁻³) y porcentaje de porosidad ($64,3 \pm 1,1$ %), fueron producidos por los procesos de carbonización y condensación del APC a 500 °C. También la reorganización del carbono condensado en la matriz del BC generó una disminución en el tamaño de partícula ($3,0 \pm 0,7$ mm) si se compara con el APC inicial ($5,0 \pm 1$), (**Tabla 4.3 y 4.9 y Fig. 4.8C y D**). Un resultado similar asociado con los cambios en la porosidad, tamaño de partícula y área superficial, fueron reportado por Lou *et al.*, (2016) [57]. En su estudio evaluaron el efecto de la temperatura de la pirólisis sobre las propiedades física y químicas de un BC obtenido a partir de APC. Los autores determinaron que al incrementar la temperatura la porosidad se incrementa porque se remueve mayor cantidad de materia volátil y esto conduce al incremento del área superficial [57]. Por otro lado, a temperaturas que oscilan entre 300 °C y 400 °C, se forman alquitranes que al ser volatizados al alcanzar temperaturas de 500 °C, dejan espacios irregulares similares a los poros [80].

En relación con el pH se observó un incremento de $3,7 \pm 0,08$ (APC) a $7,1 \pm 0,6$ (BC), lo cual se relacionó con la temperatura y composición inicial del APC. Como se presentó en el **Tabla 4.3** el APC tiene varios elementos, como Calcio, Sodio, Potasio, Manganeso, Aluminio, entre otros. Al realizar el tratamiento a 500 °C por una hora se produjeron cenizas que concentraron los minerales alcalinos y favorecieron la pérdida de grupos funcionales ácidos (grupos fenólicos y ácidos carboxílicos) por volatilización [74]. Los cambios de pH de valores ácidos a alcalinos

cuando se emplea subproductos maderables para producir biochar han sido reportados por varios autores como [Haddad *et al.*, \(2021\)](#) y [Li *et al.*, \(2019\)](#) [79,81]. En sus estudios también observaron cambios de pH asociados con la presencia de elementos en el material inicial. Que se concentran al producir el biochar y se convierten en parte de las cenizas [79,81]. Adicionalmente, los mismos autores sugieren que esta es una propiedad benéfica para el biochar, porque al utilizarlo en suelos como enmienda orgánica, puede ayudar a corregir el pH en suelos ácidos e incrementar la concentración de nutrientes para las plantas [79,81].

En relación con el análisis próximo para el APC, los porcentajes de COT, CF, VC y cenizas fueron del $57,89 \pm 0,15$ %, $14,15 \pm 0,21$ %, $80,68 \pm 0,31$ % y $5,17 \pm 0,37$ %, respectivamente. Al ser el material crudo sin transformar al que sólo se le realizó un proceso de secado para disminuir el porcentaje de humedad antes de producir el biochar; es factible que tenga bajos contenidos de CF y por el contrario la mayor proporción de carbono está asociada con la fracción volátil. Autores como [Chang *et al.*, \(2016\)](#) y [Bhowmick *et al.*, \(2018\)](#), también observaron que el aserrín de pino crudo tiende a tener mayor porcentaje de VC independiente de la especie de pino que se utilice. Lo que concuerda con nuestros resultados ya que se utilizó aserrín de pino caribe [55,73].

En el análisis próximo para el BC se observó un incremento del 11,85 % en el CF (26 ± 2 %) con respecto al APC ($14,15 \pm 0,21$ %) y una disminución en el VC ($71,6 \pm 2,4$ %). Estos resultados sugieren que a pesar de no haber producido el BC en condiciones 100 % libres de oxígeno se logró obtener un biochar con carbono condensado y las pérdidas por volatilización disminuyeron. Sin embargo, es ampliamente reportado que a temperaturas superiores a 300 °C la fracción volátil se remueve al ser convertida en H₂O, CO₂, CO, CH₄, H₂ y S [82,83].

Otro factor que ayudó a incrementar el CF fue el elevado contenido de lignina en el APC (40,9 %) la cual a temperaturas entre 450 °C y 500 °C se carboniza, reorganiza y condensa para darle estructura al biochar [15]. Unos resultados similares fueron reportados por [Lehmann *et al.*, \(2011\)](#); [Khanh *et al.*, \(2016\)](#); [Chang *et al.*, \(2016\)](#); [Igalavithana *et al.*, \(2020\)](#) [53,73,80,84]. En sus estudios produjeron biochar a partir de aserrín de pino y observaron que a temperaturas entre 500 y 600 °C el carbono fijo se incrementa a expensas del contenido de lignina. También los autores reportan que a medida que se incrementa la temperatura el rendimiento en biochar

disminuye y es más evidente cuando no se elimina la totalidad el oxígeno de los termoreactores [53,73,80,84].

Otros resultados que ayudaron a soportar la producción exitosa del BC fueron el análisis elemental, relaciones atómicas y de condensación. Como se presenta en la **Tabla 4.3.** el carbono elemental se concentró (71,04 %) y el oxígeno e hidrogeno disminuyeron con respecto al carbono (26,9 y 1,74 %). Esto pudo ocurrir por la depolimerización de la celulosa, hemicelulosa y lignina, produciendo una matriz de carbono amorfo, con posible formación de grafeno poliaromático [74]. Adicionalmente el N se concentró en el biochar (0,32 %) con respecto al APC (0,08 %). Lo que podría relacionarse con formas inorgánicas de nitrógeno como NO_3 y NO_2 , los cuales pueden formarse por la oxidación térmica de parte del Nitrógeno total y del amonio [57]. Haddad *et al.*, (2021), reportaron que en biochares producidos con aserrín de pino e impregnados con sales inorgánicas el contenido de nitrógeno elemental puede incrementarse hasta un 0,3 %, resultado similar a obtenido en el presente trabajo (0,32 %) y este contenido de nitrógeno podría mejorar las propiedades del biochar para usarlo como enmienda orgánica en suelos [79].

Con respecto a las relaciones atómicas la disminución se relacionó con el efecto del tratamiento térmico de 500 °C por 1 h. La cual ha sido reportada por diferentes autores que han trabajado con sub productos de árboles maderables [32,73,74,76]. Al igual que estos autores en la presente investigación la disminución de H/C de 0,12 (APC) a 0,02 (BC), fue atribuida a la remoción de agua, grupos OH e hidrógeno; por procesos de deshidratación y deshidrogenación [55,78]. El valor obtenido indico un incremento de la aromaticidad del BC y posiblemente tiene estructuras de grafito porque el valor fue menor a 0,1 [82]. La disminución en la relación O/C de 0,95 (APC) a 0,38 (BC) sugiere que el biochar es maduro, estable y menos polar, por la pérdida de grupos OH y grupos alifáticos [82,85]. Los cambios en la relación (O+N)/C de 0,954 en APC a 0,383 en BC también sugieren una disminución de la cantidad de grupos funcionales con oxígeno e hidrógeno y se asocian con un biochar menos polar (**Tabla 4.6**). Los resultados de las relaciones atómicas O/C y H/C, fueron menores a 0,45 y 0,6, respectivamente, indicando que el BC producido en este estudio podría ser usado en agricultura por su elevada estabilidad, siendo un resultado muy destacado porque podría emplearse como enmienda orgánica, sustrato de siembra

o soporte orgánico para formular microorganismos benéficos. Ayudando a mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo [32,79,81].

Las relaciones E_4/E_6 disminuyeron en los pasos de extracción, alcalina, ácida y alcalina, sugiriendo que el BC está compuesto mayoritariamente por compuestos aromáticos modificados por el tratamiento térmico de las diferentes subunidades de fenil propano que conforman la lignina. Estas sustancias aromáticas definitivamente no son ácidos fúlvicos o húmicos, pero si son materiales aromáticos altamente condensados que podrían ayudar a mejorar las propiedades del suelo, como el pH, la capacidad de intercambio catiónico, la porosidad y textura [81]. De esta forma al aplicar BC al suelo se podría complementar el ciclaje natural del carbono. En el cual se producen las sustancias húmicas a través del proceso de humificación por vía biológica. Incorporando dos tipos carbono estables y de lenta liberación a partir de procesos diferentes [86].

4.4.2. Diseño factorial 2^3 para la selección de las condiciones de producción de biochar

Para la producción de BC se deben tener en cuenta varias condiciones de operación que afectan la calidad del BC a obtener. Entre las más relevantes se destacan el tipo de material crudo a convertir a BC, la temperatura, la concentración reducida o ausente de oxígeno y el tiempo de proceso [7,32]. En el presente sub capítulo se utilizó el aserrín de pino y se seleccionaron las condiciones de producción a través de un diseño factorial 2^3 . De acuerdo con los resultados obtenidos los factores A (temperatura), interacción BC (Tiempo: Inyección de N_2) e interacción ABC (temperatura: Tiempo: Inyección de N_2 e interacción) fueron los que tuvieron en efecto positivo sobre la producción de BC, determinando que de los ocho tratamientos evaluados se seleccionaran el T2 y T8, por ser estadísticamente diferentes a los demás en relación con el porcentaje de carbono fijo (Fig. 4.6 y Tabla 4.4).

Estos dos tipos de BC se produjeron a 500 °C, pero con tiempos de residencia o tratamiento térmico diferentes (1 h y 3 h para T2 y T8, respectivamente). Por lo que se generaron características físicas y químicas diferentes (Fig. 4.6). Aun así, los dos tipos de BC al ser producidos a la misma temperatura, pero con tiempos diferentes pasaron por tres etapas: La primera fue la deshidratación del APC que ocurre a temperaturas entre 0-300 °C; en este rango el APC comienza a sufrir pérdidas de agua, descomposición térmica y una ligera concentración

de componentes [87]. La segunda etapa fue la combustión, en la cual inician los procesos de volatilización de las fracciones más lábiles asociadas con el carbono alifático, nitrógeno y azufre. Ocurre en rangos de temperatura de oscilan entre 250 °C y 350 °C. Así mismo la hemicelulosa, celulosa y lignina, sufren procesos de degradación térmica a estas temperaturas [57]. La tercera es la carbonización de la materia orgánica y condensación de la fracción más estable del carbono en el BC, la cual se inicia a temperaturas de 300 °C hasta alcanzar los 500 °C o más [16,87].

En relación con la inyección de N₂ al BC T2 no se le adiciono el gas inerte durante el tratamiento térmico y al BC T8 se le adicionó nitrógeno (150 mg mL⁻¹) cada media hora hasta completar las 3 horas de proceso. La literatura reporta que la inyección de nitrógeno genera condiciones reducidas del oxígeno, esto se debe a desplazamiento del O₂ por un gas inerte dentro de la cámara en la que se produce el BC. La presencia de N₂ favorece la combustión incompleta del carbono; impidiendo que se oxide en su totalidad hasta CO₂ y se obtenga un BC con mayor contenido de carbono fijo y menores pérdidas por volatilización [88,89].

Las razones por las cuales no se observó una gran diferencia al emplear o no el N₂, se podrían atribuir al paso previo en cámara de anaerobiosis por 12 horas que se le realizó al APC. Estas cámaras consisten en unas jarras de plástico con una tapa que cierra herméticamente. La atmósfera anaerobia se logra al emplear un catalizador comercial que genera hidrógeno y CO₂. El H₂ se combina con el O₂ del aire para formar agua. Al realizar este tratamiento posiblemente se logró reducir el O₂ gaseoso presente en los poros de APC de tal manera que al pasarlo a la mufla y elevar la temperatura se logró la producción del BC T2 con mayores porcentajes de carbono fijo que el BC T8 (**Fig. 4.6**). Por esta razón, se tomó la decisión de continuar trabajando con el BC T2 debido a que se puede producir en una hora de tratamiento térmico y no se requiere la inyección de pulsos de N₂. Esto reduce los costos de producción del BC y facilitaría su escalamiento futuro.

En la **Tabla 4.5**, se presentan con más detalle las características de este BC. La humedad del BC disminuyó por el proceso de deshidratación del APC ($3,6 \pm 0,51$ %). El incremento en la densidad ($0,42 \pm 0,1$ g cm⁻³) y porcentaje de porosidad ($64,3 \pm 1,1$), fueron producidos por los procesos de carbonización y condensación del APC a 500 °C. También la reorganización del carbono condensado en la matriz del BC generó una disminución en el tamaño de partícula

(Tabla 4.5 y Fig. 4.7). Un resultado similar fue reportado por Lou *et al.*, (2016). En su estudio evaluaron el efecto de la temperatura de la pirólisis sobre las propiedades física y químicas de un BC obtenido a partir de aserrín de pino. Los autores determinaron que al incrementar la temperatura la porosidad incrementa porque se remueve mayor cantidad de materia volátil y esto conduce al incremento del área superficial [57]. Por otro lado, a temperaturas que oscilan entre 300 °C y 400 °C, se forman alquitranes que al ser volatizados al alcanzar temperaturas de 500 °C, dejan espacios irregulares similares a los poros. Estos pueden tener diferente diámetro interno y oscilar entre <2,0 y 5,0 mm. Siendo considerados microporos y mesoporos [82].

En relación con el pH se observó un incremento de $3,7 \pm 0,08$ a $7,1 \pm 0,6$, lo cual se relacionó con la temperatura y composición inicial del APC. Como se presentó en la Tabla 4.3. el APC tiene varios elementos, como Calcio, Sodio, Potasio, Manganeso, Aluminio, entre otros. Al realizar el tratamiento a 500 °C por una hora se produjeron cenizas que concentraron los minerales alcalinos y favorecieron la pérdida de grupos funcionales ácidos (grupos fenólicos y ácidos carboxílicos) por volatilización [82]. Estos cambios en el pH podrían favorecer los procesos de movilización de nutrientes que son limitantes para las plantas [35].

En relación con el análisis próximo los resultados sugieren que parte del carbono orgánico total se perdió en la fracción volátil ($71,6 \pm 2,4$ %) y por esto el rendimiento de BC fue bajo ($19 \pm 0,7$ %) si se compara con los biochares producidos atmosfera 100 % libre de oxígeno [83,90]. Esto se podría atribuir a que temperaturas altas la fracción volátil se remueve al ser convertida en H₂O, CO₂, CO, CH₄, H₂ y S [82]. Adicionalmente, dentro de los componentes del APC está la lignina, la hemicelulosa y la celulosa, los dos últimos en una atmósfera con bajas tensiones de oxígeno se volatilizan debido a la escisión térmica de las unidades monoméricas de los heteroglucanos y homogluconos. La hemicelulosa es la más lábil desde el punto de vista térmico y se descompone primero en un rango de temperatura de 220 – 315 °C. La celulosa es más estable térmicamente debido a su estructura cristalina, se descompone a una temperatura más alta de 315 – 400 °C. Por el contrario, la lignina es un polímero significativamente más heterogéneo y se descompone a temperaturas que oscilan entre 190 – 900 °C [91]. La carbonización de este polímero permitió que se formara un carbono poliaromático, condesando, hidrofóbico por la pérdida de hidrógeno, monóxido de carbono y dióxido de carbono. Por esta razón, parte del carbono se concentró en la fracción fija (26 ± 2 %). Un resultado similar fue

reportado por [Lehmann *et al.*, \(2011\)](#). En su trabajo produjeron BC a partir de aserrín de pino y observaron que a temperaturas de 500 °C el carbono fijo se incrementa a expensas del contenido de lignina [84].

Otros resultados que ayudaron a soportar la producción exitosa del BC fueron el análisis elemental, relaciones atómicas y de condensación. Como se presenta en la [Tabla 4.6](#), el carbono elemental se concentró (71,05 %) y el oxígeno e hidrogeno disminuyeron con respecto al carbono (26,9 y 1,74 %). Esto pudo ocurrir por la depolimerización de la celulosa, produciendo una matriz de carbono amorfo, formación de grafeno poliaromático y remoción de otros átomos que no son carbono. Posteriormente y dependiendo del tiempo de tratamiento el carbono amorfo puede incorporarse a las láminas de grafeno del carbono turboestático [82].

Las relaciones E_4/E_6 disminuyeron en los pasos de extracción, alcalina, ácida y alcalina, sugiriendo que el BC está compuesto mayoritariamente por compuestos aromáticos modificados por el tratamiento térmico de las diferentes a las sub unidades de fenil propano que conforman la lignina. Estas sustancias aromáticas definitivamente no son ácidos fúlvicos o húmicos, pero si son materiales aromáticos altamente condensados que podrían ayudar a mejorar las propiedades del suelo, como el pH, la capacidad de intercambio catiónico, la porosidad y textura [81]. De esta forma al aplicar BC al suelo se podría complementar el ciclaje natural del carbono. En el cual se producen las sustancias húmicas a través del proceso de humificación por vía biológica. Incorporando dos tipos carbono estables y de lenta liberación a partir de procesos diferentes [86].

4.4.3. Espectroscopia de infrarrojo con arreglos de Fourier para BC T2

La presencia de enlaces simétricos sencillos C-O (1025 cm^{-1}), enlaces dobles C=C (1585 cm^{-1}) y C=O (1740 cm^{-1}), son característicos en los subproductos de aserrío que contienen celulosa, hemicelulosa y lignina [73]. La presencia de estiramientos O-H entre $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ no fue muy definida, solamente se observó una pequeña banda a 3330 cm^{-1} y se esperaba que esta banda fuera más notoria ya que se relaciona con la abundancia de grupos OH unidos a hidrógeno, agua intersticial localizada entre la celulosa y la hemicelulosa [Lou *et al.*, \(2018\)](#). Su baja intensidad podría relacionarse con el proceso de pre secado que se le hizo al APC antes de producir el BC ([Fig. 4.7](#)), [92]. Al producir el BC desaparecieron las señales asociadas con el carbono más lábil

(C-O) y con grupos hidroxilo (O-H). Demostrando que a 500 °C se elimina agua, grupos alifáticos y polares. Un resultado similar fue reportado por Lou *et al.*, (2018), en su estudio produjeron BC a diferentes temperaturas empleando aserrín como materia prima y observaron que los BC producidos a 500 °C pierden mayor número de grupos funcionales O-H, alifáticos que los obtenidos a 300 °C [57].

Por otro lado, los enlaces más estables como C=C (1585 cm⁻¹), enlaces dobles C=O (1740 cm⁻¹) y enlaces C-C (1365 cm⁻¹), se concentraron en BC y posiblemente fueron los responsables de disminuir la polaridad (Fig. 4.7). Estos resultados se relacionaron con los índices de aromaticidad H/C y O/C, en los cuales se obtuvieron valores inferiores a 0.3. Siendo unos resultados similares a los reportados por Lou *et al.*, (2016); Stefolova *et al.*, (2017); Liu *et al.*, (2020); Haddad *et al.*, (2020).

De acuerdo con Jouiad *et al.*, (2015), picos entre 1400 cm⁻¹ y 900 cm⁻¹ generalmente se atribuyen a la lignina, principalmente debido a anillos de tipo C=C y son ligeramente más pronunciados que los encontrados para la hemicelulosa y la celulosa. La reducción en la señal o ausencia de pico pudo estar asociada a la degradación de la lignina, la cual ocurre a temperaturas entre 200 °C y 700 °C [93]. En cuanto al pico generado a 2960 cm⁻¹, Suarez *et al.*, (2017) indicaron que corresponde a grupos funcionales alifáticos (enlaces C-H). Lo que coincide con el resultado obtenido en este estudio para las muestras de BC y BC/BPS (Fig. 4.7), [92].

El análisis FTIR también mostró los cambios ocurridos en los componentes principales del APC (celulosa y la lignina) durante la carbonización, desde la formación y pérdida de carbono aromático hasta la pérdida diferencial de contenido de carbono y oxígeno [94]. De acuerdo con Lou *et al.*, (2016), la reducción de grupos funcionales polares en la superficie del BC es el producto de las reacciones de deshidratación y despolimerización que ocurre durante la pirólisis, y que también condujeron a la síntesis de estructuras aromáticas y gráficas [57]. Las señales obtenidas en este estudio, correspondientes a enlaces C-O (1025 cm⁻¹) y H-O-H (3330 cm⁻¹) presentes únicamente en la muestra de APC como material de partida para la producción de BC y en el BC/BPS, coinciden con la información reportada por Moreno-Bayona *et al.*, (2019) quienes sugieren que estos picos corresponden a un material en estado oxidado e hidratado como lo es el aserrín [32].

4.4.4. Estudios de adsorción para las bacterias fosfato solubilizadoras

En los estudios de adsorción para las BPS se eligieron condiciones en las que las bacterias se adhirieran al BC al determinar que el punto de carga cero de este fue superior ($4,1 \pm 0,8$) al pH de la solución ($3,0 \pm 0,2$) al cual se presenta una mejor adsorción de las BPS [95]. La adsorción de las BPS se relaciona con la carga superficial negativa de la fase sólida (BC) que se produce al entrar en contacto con la fase líquida cuando esta se encuentra a un pH ácido, como sucedió en este estudio [96]. Escalante Rebolledo *et al.*, (2016) afirman en su estudio, que es posible que un BC pueda presentar un punto de carga neta cero, de manera similar al término usado en los suelos, el cual depende de la temperatura de pirólisis a la cual se produce, y que el área superficial de un BC recién producido parecen incrementarse con la temperatura de la pirólisis [97].

En relación con la adsorción de las BPS al BC, se sabe que la pared de las bacterias contiene polisacáridos (peptidoglucano), proteínas y lípidos, que pueden ser considerados como polielectrólitos con grupos amino, carboxilo, fosfato y sulfato [98]. Estos grupos funcionales pueden actuar como ligandos a ciertos grupos funcionales presentes en el BC. La adsorción de las mismas al soporte está influenciada por el tiempo de contacto en el interfaz sólido líquido, los procesos de difusión, la concentración del adsorbato/bacterias, el tratamiento previo que se le haya dado al adsorbente/BC (pirólisis lenta) y el pH de la solución en las que se encuentran las bacterias y el BC [99].

El pH es un factor importante para adsorción de los microorganismos a diferentes tipos de soportes, porque pueden incrementar o disminuir la cantidad de células que se adsorben por la interacción entre la pared de las bacterias y los grupos funcionales del BC. A pH ácidos ($3,0$) y más bajos que el punto isoeléctrico el BC ($4,1$), el BC se carga positivamente favoreciendo la atracción de las bacterias que tienen grupos funcionales cargados negativamente [32,57]. Otros factores que pudieron permitir la adsorción fueron la porosidad del BC, la superficie de contacto y la producción de exopolisacáridos, que también se adsorben al BC dado que estos polímeros tienen carga negativa [32,42].

Por el contrario, a pH de $5,0$ y $8,0 \pm 0,2$ el BC cambia su carga superficial e incrementan las cargas negativas ($\text{pH} > \text{PI}$), causando una disminución en la adsorción de las bacterias porque se presenta repulsión entre cargas negativas de las células y el BC. Esto fue más evidente a pH de

$8,0 \pm 0,2$ que a $\text{pH } 5,0 \pm 0,2$. Lo que indica que a $\text{pH } 5,0 \pm 0,2$ pueden estar presentes grupos funcionales con carga positiva y negativa. Sin embargo, por los resultados del valor de q_e en función del tiempo se podría suponer los grupos con carga negativa están en mayor cantidad que los de carga positiva. Dado que los resultados tienen a estar más cercanos al pH de $3,0 \pm 0,2$, esto se podría comprobar al realizar un estudio más detallado de los grupos funcionales ácidos y alcalinos presentes en el BC.

Los resultados de adsorción presentados en este trabajo son muy relevantes para el estudio de bacterias fosfato solubilizadoras y su interacción con materiales orgánicos como un BC. Ya que la mayoría de los estudios se centra en el uso del BC como adsorbente para remover contaminantes en aguas y suelos, pero son limitados los estudios de adsorción de bacterias al BC.

4.4.5. Estudios de adsorción para ortofosfatos

El pH es un factor crítico que influye en la capacidad de adsorción de un adsorbente en solución. El modelo de pseudo-segundo orden aplicado en el proceso de adsorción de ortofosfatos al BC, sugirió que los sitios activos de BC eran heterogéneos, razón por la cual exhibieron diferentes energías de activación y esto influyó en la baja capacidad de adsorción a $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$. De acuerdo con [Li *et al.*, \(2017\)](#), la capacidad de adsorción de fosfato aumento con el aumento de pH de la solución por la disminución de las cargas negativas en la superficie del BC [100]. Aunque la concentración de ortofosfatos adsorbida al BC fue baja, se observó que en las primeras horas el proceso fue más rápido, seguido de una adsorción relativamente lenta, similar a otros estudios [100–102]. La baja capacidad de adsorción podría deberse a la repulsión electrostática entre las superficies del BC cargado negativamente y los iones fosfato cargados también negativamente [102]. De acuerdo con [Yao *et al.*, \(2011\)](#) los resultados obtenidos en este estudio, también sugieren que la superficie intrapartícula abundante en mesoporos, pudo tener un papel importante en la baja capacidad de adsorción de ortofosfatos al BC [103]. [Jung *et al.*, \(2015\)](#) evaluaron la capacidad de adsorción de fosfato de un BC producido a partir residuos de macro algas marinas a diferentes temperaturas e indicaron que cuando la temperatura de pirólisis fue >400 °C se redujo la capacidad de adsorción de fosfato debido a que entre mayor sea la temperatura de pirólisis mayor es el contenido de cenizas en las que se concentran los metales alcalinos como Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} que poseen bajos potenciales iónicos y no se pierden por

volatilización, lo que genera disminución en los sitios de adsorción en la superficie del BC; por lo tanto, también disminuye la capacidad de adsorción de ortofosfatos. Lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio [104]. Wabel *et al.*, (2013) reportaron que tras el proceso térmico, los grupos funcionales polares del BC tienden a disminuir, lo que resulta en un aumento de la aromaticidad y una disminución de la polaridad del BC, influyendo en una baja adsorción de P en el BC [105]. Otra teoría que soporta la baja capacidad de adsorción de ortofosfatos al BC en este estudio, es la reportada por Borno *et al.*, (2018), quienes afirman que entre más alto sea el pH del BC, la carga positiva del Fe y Al contenidos en este disminuye, y por lo tanto también disminuye la afinidad por la adsorción de P [106]. El BC T2 presentó baja adsorción de ortofosfatos (2,5 mg g⁻¹) debido a que generalmente la carga superficial de este material es negativa, lo que influye en la capacidad de adsorción de P por tratarse este último de un ion cargado negativamente (anión), lo que coincide con lo reportado por Lou *et al.*, (2016).

Hardie *et al.*, (2015) sugieren que la capacidad del BC para retener fosfato está relacionada con las propiedades del mismo [107]. Dado que el BC evaluado en este estudio presentó baja capacidad de adsorción de ortofosfatos, se considera la hipótesis de que tras la aplicación de BC de APC en el suelo los iones fosfato permanecen disponibles en la solución del suelo para nutrir a la planta, en este caso de *Allium cepa* L., la cual presenta un sistema de raíces poco profundas y no ramificadas lo cual hace que esta especie vegetal sea más susceptible a las deficiencias de nutrientes como el P [108,109].

4.4.6. Formulación de las bacterias fosfato solubilizadoras al biochar y caracterización

Para la aplicación en sólido de microorganismos benéficos a suelos se emplean una gran variedad de materiales; estos deben garantizar la supervivencia de los microorganismos, su actividad biológica y protegerlos de estrés biótico y abiótico [110]. Un buen soporte o carrier, debe ser económico, fácil de usar, fácil de adquirir, debe permitir el intercambio gaseoso y mantener la humedad. Por otro lado, no debe ser tóxico para los microorganismos ni para las plantas [41,110]. Al igual que Zheng *et al.*, (2019), en esta investigación se estudió el uso de BC como soporte de microorganismos teniendo en cuenta las características físico químicas del BC ya que estas son las que definen si el soporte es apto para proporcionar un hábitat apropiado para las bacterias y así garantizar su supervivencia y abundancia; y la adquisición y movilidad de los nutrientes [77]. La estabilidad de las BPS en el BC a los 150 días, en donde la población de BPS

solamente presentó una ligera disminución de la viabilidad en los 8 primeros días (de $1,0 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^2$ BPS g^{-1} a $1,0 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^1$ BPS g^{-1}) y posteriormente se mantuvo en ese mismo orden hasta los 150 días, es similar al reporte de Sun *et al.*, (2016) quienes usaron BC de madera de pino como soporte de un inóculo bacteriano, y al cabo de 3 meses obtuvieron una disminución de sólo un orden de magnitud en los recuentos y al cabo de 5 meses las poblaciones no disminuyeron su viabilidad [111]. En la presente investigación, una leve pérdida en la viabilidad de las bacterias se asoció principalmente a un posible estrés que sufren las BPS durante el proceso de co inoculación y adaptación al nuevo material orgánico en el cual fueron formuladas. Posteriormente los recuentos se mantuvieron en el orden de $1,0 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^1$ BPS g^{-1} hasta finalizar los 150 días (Fig. 4.12). Estos resultados son consistentes con los reportados por Hale *et al.*, (2014) encontraron que la densidad de población de *Enterobacter cloacae* soportada en BC de madera de pino fue más de 10 veces mayor cuando las células se formularon en el portador de BC en comparación con el inóculo de bacteria aplicado directamente [112]. Adicionalmente, en la Fig. 4.12 se observa una disminución en el porcentaje de humedad del 90 al 67 % que también pudo relacionarse directamente con la disminución de los recuentos, que se pudo haber dado como consecuencia de los procesos de evaporación del agua en la que se dosificaron las BPS durante el proceso de evaluación [111].

Por otro lado, al comparar el BC sin bacterias y co inoculado con las BPS, se observaron algunos cambios en las características físicas y químicas del material (Tabla 4.9). Entre los cambios más notorios se observó un incremento en el carbono volátil (75 ± 3 %), en el contenido elemental del oxígeno (73,61 %), hidrógeno (1,23 %), relación atómica H/C (0,05) y O/C (2,93). Los cuales se relacionaron con la hidratación del BC al coinocularlo con una suspensión de BPS que también tienen agua, carbono, nitrógeno y otros elementos, aportados por el medio de cultivo en el cual se produjeron las BPS. El hecho de que el BC sin bacterias tiende a ser hidrofílico por el material altamente condensado que se formó a 500 °C esto no impidió que adsorbiera agua y se favoreciera la coinoculación de las BPS. Bajos las condiciones experimentales evaluadas se pudieron dar dos etapas, en la primera las BPS se adsorben a la superficie del BC. Proceso que se favoreció por el pH de la suspensión de bacterias (3,3), este valor está por debajo del punto de carga cero del BC y hace que la superficie adquiera carga positiva, permitiendo que las BPS se adsorban a la superficie a través de interacciones químicas tal y como se demostró con los estudios de adsorción (Fig. 4.10 y Tabla 4.7). Posteriormente las BPS pudieron formar biopelículas por la producción de exopolisacáridos y se adhirieron con mayor fuerza a la

superficie del BC. Por último, la distribución espacial de las BPS no sólo fue superficial, también gran cantidad de ellas se ubicaron dentro y alrededor de los poros que se formaron a 500 °C (Fig. 4.12). En un estudio previo Moreno-Bayona *et al.*, (2019), observaron que estas mismas bacterias se inmovilizan en mayor cantidad entre más poroso sea el material y esto depende de la materia prima a partir del cual se produce el BC y de las condiciones de producción [32].

4.5. Conclusión

El BC producido a partir de aserrín de pino caribe (APC) como biomasa lignocelulósica mostró tener características orgánicas asociadas a aromaticidad y grupos funcionales, y características físico químicas como el contenido de cenizas y el rendimiento de biomasa en biochar que permiten usarlo como soporte de las bacterias fósforo solubilizadoras (BPS) del bioinoculante producido en el capítulo 3 de esta investigación. El tratamiento térmico favoreció la formación de nuevas bandas que no estaban presentes en el (APC). El uso de BC abre oportunidades esenciales para la gestión sostenible de la agricultura en Colombia.

Sección 2. Producción de biochar a partir de residuos lignocelulósicos y polietileno oxodegradable, enriquecido con BPS

Como se mencionó en la introducción, en paralelo con el desarrollo experimental del presente capítulo, las mismas bacterias se emplearon para formular un BC complementario al producido este estudio. El BC evaluado se produjo a partir de la conversión térmica o copirólisis de un material crudo compuesto por corteza de pino caribe, servilletas de celulosa e hidrolizado de levadura cervecera. Que se utilizó para el cotratamiento de biomasa lignocelulósica y polietileno de baja densidad, empleando a *Pleurotus ostreatus* a escala de laboratorio. El BC producido se empleó para inmovilizar a las BPS y evaluar su efecto sobre el crecimiento de *A. cepa* L. a escala de invernadero [32].

4.6. Materiales y métodos

Para este BC se hicieron algunas modificaciones en la producción, inicialmente el material crudo se secó el BC por 24 horas a 90 °C y se tamizó para obtener un tamaño de partícula de 5 mm aproximadamente. Se colocaron 100 g en recipientes de aluminio, se introdujeron en una mufla (marca Labtech™) y se aplicó una rampa de calentamiento a razón de 10 °C min⁻¹ hasta alcanzar 300 ± 3 °C de temperatura, luego se inyectó N₂ (150 ± 5 mL min⁻¹). La adición de N₂ se repitió a los 30 minutos para producir el BC (BC300) bajo condiciones reducidas de O₂. Al material crudo y al BC se les determinaron las mismas variables de respuestas que se analizaron para el BC de sólo aserrín de pino. La formulación con las bacterias fosfato solubilizadoras se realizó de la misma forma que en la **sección 1** de este capítulo. Por otro lado, se realizaron estudios de la estabilidad (viabilidad) de las bacterias por un período de dos meses. El almacenamiento se realizó a 19 ± 2 °C (**Fig. 4.13**).

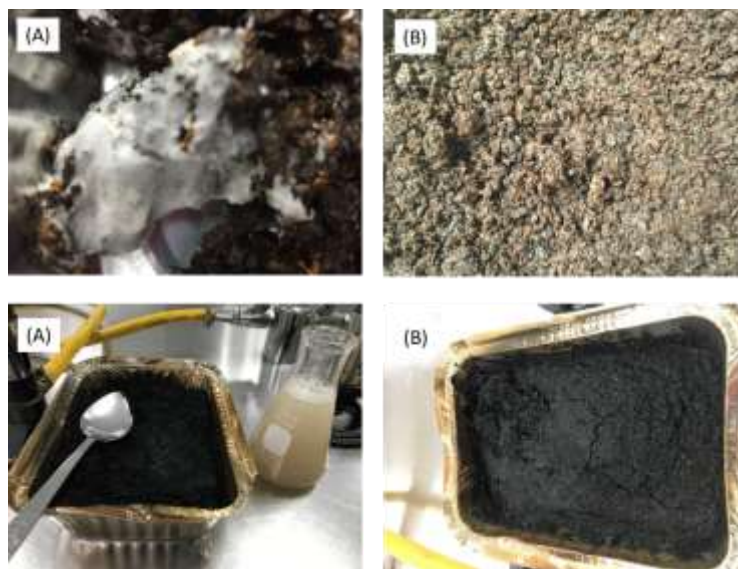


Figura 4.13. Producción del BC complementario. (A) Material crudo húmedo. (B) Material crudo seco y tamizado. (C) Formulación del BC con *Pseudomonas* sp, *Kosakonia* sp y *Serratia* sp. producidas en medio MT11B por 6 h a 200 rpm. (D) BC obtenido a partir de la mezcla de corteza de pino, servilletas de celulosa e hidrolizado de levadura cervecera con las tres BPS.

Por último, se estudió del efecto del BC300/BPS/SC sobre el crecimiento de la hortaliza *Allium cepa* a escala de invernadero. Se utilizaron recipientes plásticos de 15 mL en los cuales se dispusieron los siguientes tratamientos: BC300/BPS/SC al 1% (p/v) + suelo + semillas de *A. cepa* (T1); BC300/BPS/SC al 2% (p/v) + suelo + *A. cepa* (T2) y BC300/BPS/SC al 100% (p/v) + suelo + *A. cepa* (T3). Como controles se evaluaron: Suelo 100% + *A. cepa* (C1), BC300/BPS/SC al 100% + *A. cepa* (C2). BPS al 100% + *A. cepa* (C3). BC300 100% sin BPS + *A. cepa* (C4). A continuación, se sembraron 5 semillas de *A. cepa* una profundidad de 3 cm y se cubrió con el mismo material. Los recipientes se mantuvieron bajo condiciones de invernadero (15 ± 3 °C) con períodos de luz-oscuridad de 12 horas por cinco semanas y al finalizar el tiempo de evaluación se determinaron como variables de respuesta en plántulas el peso fresco (g) y la altura (cm) ($n=5$). En las muestras sólidas se determinó el recuento de BPS y el pH [32].

Los resultados para la producción de BC y ensayos con *Allium cepa* se evaluaron por medio de una prueba de normalidad o test de Shapiro-wilk y una prueba de homogeneidad de varianzas (test de Levenne) con el programa SPSS® (IBM Corp. 2013. IBM SPSS para Macintosh versión 22.0. Armonk, NY: IBM Corp). Posteriormente, se realizó un

análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias entre los tratamientos que fue complementado con una prueba de comparaciones múltiples *post-hoc* (Prueba de Tukey).

4.7. Resultados

4.7.1. Producción y uso del biochar (BC) en invernadero, caracterización y propiedades

El bio-producto sólido orgánico que se obtuvo después de 75 días de transformación en todos los sistemas de microcosmos (tratamientos y controles) se mezcló para utilizarlo como raw material (RM) para realizar la producción del BC. De acuerdo con los resultados presentados (**Tabla 4.10**), el material crudo tenía pH de $6,1 \pm 0,2$, 74 % de materia orgánica (OM), 56 % de COT, 3,7 % de Nitrógeno total, relación C/N de 15, el recuento de bacterias totales fue de 2,0 Log₁₀ de BPS g⁻¹ y hongos totales (*P. ostreatus* y levaduras) 4,0 Log₁₀ de BPS g⁻¹.

Al realizar la producción del BC (BC 300 °C) se observó un cambio en todos los parámetros, el pH se incrementó a $7,3 \pm 0,2$, los porcentajes de MO y COT disminuyeron a 54 y 31 % respectivamente y todos los recuentos de microorganismos fueron menores a 2,0 Log₁₀ de BPS g⁻¹. En relación con el análisis próximo el rendimiento en BC fue del 53 % y la humedad del 0,1 %. Las fracciones de carbono fueron de 72, 25 y 2,9 %, para la fracción volátil, la fracción fija y las cenizas, respectivamente; por lo que el BC producido fue clasificado como clase II (carbono orgánico \geq a 30 y \leq a 60 %), [113]. La composición elemental asociada con el contenido de C, H y O, se evaluó en el RM y el BC producido. El proceso termoquímico generó un incremento en el contenido de carbono elemental (de 44,5 a 87 %) y una disminución del contenido de oxígeno e hidrógeno de 12,5 y 0,5 % respectivamente. El grado de maduración y la aromaticidad se determinó calculando las relaciones molares de H/C y O/C, obteniendo valores de 0,105 y 0,143 respectivamente (**Tabla 4.10**).

Una vez se produjo y caracterizó el BC, fue enriquecido y formulado con bioinoculante de BPS conformado por *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp. [32,71].

El BC inicial (I) recién enriquecido con BPS (BC300/BPS/I) y el que se obtuvo a las 24 horas de cultivo secundario (CS) a 30° C (BC300/BPS/SC), también fueron caracterizados para detectar posibles cambios en la propiedades básicas, análisis próximo, análisis elemental y

recuento de microorganismos. En el BC recién enriquecido se observó una disminución en el pH ($5,9 \pm 0,2$), incrementos en los porcentajes de materia orgánica y COT (82 y 48 %), lo que podría relacionarse con la adición del cultivo líquido bacteriano. A las 24 h de cultivo secundario, el pH se incrementó a $7,0 \pm 0,2$ al igual que la MO y el COT (95 y 53 % respectivamente). Estos incrementos se relacionaron con el crecimiento de las BPS dentro del BC300 y la posible formación de biopelícula. Los recuentos de BPS iniciales y a las 24 horas fueron altos ($9,5$ y $10,9$ Log_{10} BPS g^{-1} respectivamente). El incremento de 1,5 unidades logarítmicas sugiere que el cultivo secundario permitió la multiplicación de algunas células injuriadas. Los recuentos por morfotipo fueron altos y similares (oscilaron entre $8,3$ y $10,9$ Log_{10} BPS g^{-1}); demostrando que el proceso de formulación no afectó a ninguna de las bacterias que conforma el consorcio de bacterias fosfato solubilizadoras (**Tabla 4.10**).

Los resultados del análisis próximo se presentan en la **Tabla 4.10**. El rendimiento en BC 300 °C no cambió durante el proceso de formulación porque no se sometió a ningún tratamiento térmico adicional, por lo tanto, siguió siendo del 53 %. La humedad y la fracción volátiles se incrementaron con respecto al BC inicial obteniendo porcentajes del 63, 61, 81 y 82 % para BC BC300/BPS/I y tras el cultivo secundario BC BC300/BPS/SC. El incremento está asociado con el proceso de formulación por la impregnación húmeda de las BPS. Por el contrario, la fracción fija y las cenizas disminuyeron levemente al compararlas con el BC inicial. Para el BC BC300/BPS/I y el BC BC300/BPS/SC los resultados fueron 17 y 16 %, para la fracción fija y 1,3 y 1,9 %, para las cenizas, respectivamente. El carbono elemental para BC300/BPS/I y BC300/BPS/SC disminuyó (54,7 y 53 % respectivamente) con respecto al BC inicial sin bacterias fosfato solubilizadoras, porque al realizar una formulación en base acuosa el BC adquiere, agua y por consiguiente mayor proporción elemental de H y O. Este cambio fue soportado por las relaciones H/O y C/O, las cuales se incrementaron por encima de 0,2; demostrando la mayor presencia de grupos polares y el mayor contenido de agua (**Tabla 4.10**).

Tabla 4.10. Análisis próximo y elemental para el material crudo, el BC producido a 300° C y proceso de formulación con BPS

Parámetro	Aserrín	BC300 Inicial	BC300 con BPS formulación inicial BC300/BPS/I	BC300 con BPS a 30° C/24 h BC300/BPS/SC
Propiedades básicas				
pH	6,1 ± 1,1	7,3 ± 0,1	5,9 ± 0,2	7,0 ± 1
MO (%)	74 ± 3	54 ± 3	82 ± 4	95 ± 6
COT (%)	56 ± 4	31 ± 1	48 ± 3	53 ± 2
N (%)	3,7	ND	ND	ND
C/N ratio	15	ND	ND	ND
Recuento de bacterias totales (Log ₁₀ BPS g ⁻¹)	2,0	<2,0	9,5 ± 1,1	10,9 ± 1,7
Recuento de hongos totales (Log ₁₀ BPS g ⁻¹)	4,0	<2,0	<2,0	<2,0
Recuento de BPS totales (Log ₁₀ BPS g ⁻¹)	<2,0	<2,0	9,5 ± 1,1	10,9 ± 2,3
Recuento de <i>Pseudomonas</i> sp. (Log ₁₀ BPS g ⁻¹)	<2,0	<2,0	8,3 ± 1,4	8,7 ± 1,9
Recuento de <i>Serratia</i> sp. (Log ₁₀ BPS g ⁻¹)	<2,0	<2,0	9,4 ± 1,8	9,3 ± 2,2
Recuento de <i>Kosakonia</i> sp Log ₁₀ BPS g ⁻¹	<2,0	<2,0	8,6 ± 1,2	10,9 ± 1,4
Análisis próximo				
Rendimiento (%)	-	53 ± 2	53 ± 2	53 ± 2
Humedad (%)	10 ± 2	0,1 ± 0,02	63 ± 3	61 ± 2
Carbono Volátil (%)	85 ± 5	72 ± 4	81 ± 2	82 ± 5
carbono fijo (%)	12 ± 2	25 ± 3	17 ± 2	16 ± 4
Cenizas (%)	1,2 ± 0,6	2,9 ± 0,9	1,3 ± 0,3	1,9 ± 0,4
Análisis elemental				
C	44,5	87	54,7	53
O	50,8	12,5	32,8	33,5
H	4,7	0,5	12,5	13,5
H/C Molar	0,105	0,0057	0,22	0,254
O/C Molar	1,14	0,143	0,59	0,63

En relación con las imágenes de la **Fig. 4.14**, se pudo apreciar que el RM es una mezcla húmeda y heterogénea de LCB con diferentes grados de transformación y micelio fúngico de *P. ostreatus* (zonas de color blanco y textura algodonosa), (**Fig. 4.14A**). En las imágenes de MEB para el RM se observaron con mayor claridad las hifas delgadas y las esporas esféricas de *P. ostreatus* (**Fig. 4.14B**). Al producir el BC300 se obtuvo un material más homogéneo, de color negro y seco (**Fig. 4.14C**). En la imagen de MEB del BC300/I se observan estructuras con forma de panel, superficie lisa y algunos fragmentos de micelio o debris celulares, postratamiento térmico a 300° C (**Fig. 4.14D**). En el BC300/BPS/SC se observó la formación de una biopelícula uniforme sobre la superficie del BC, la cual podría relacionarse con el crecimiento de las bacterias al incubarlas por 24 h a 30° C (**Fig. 4.14E y D**).

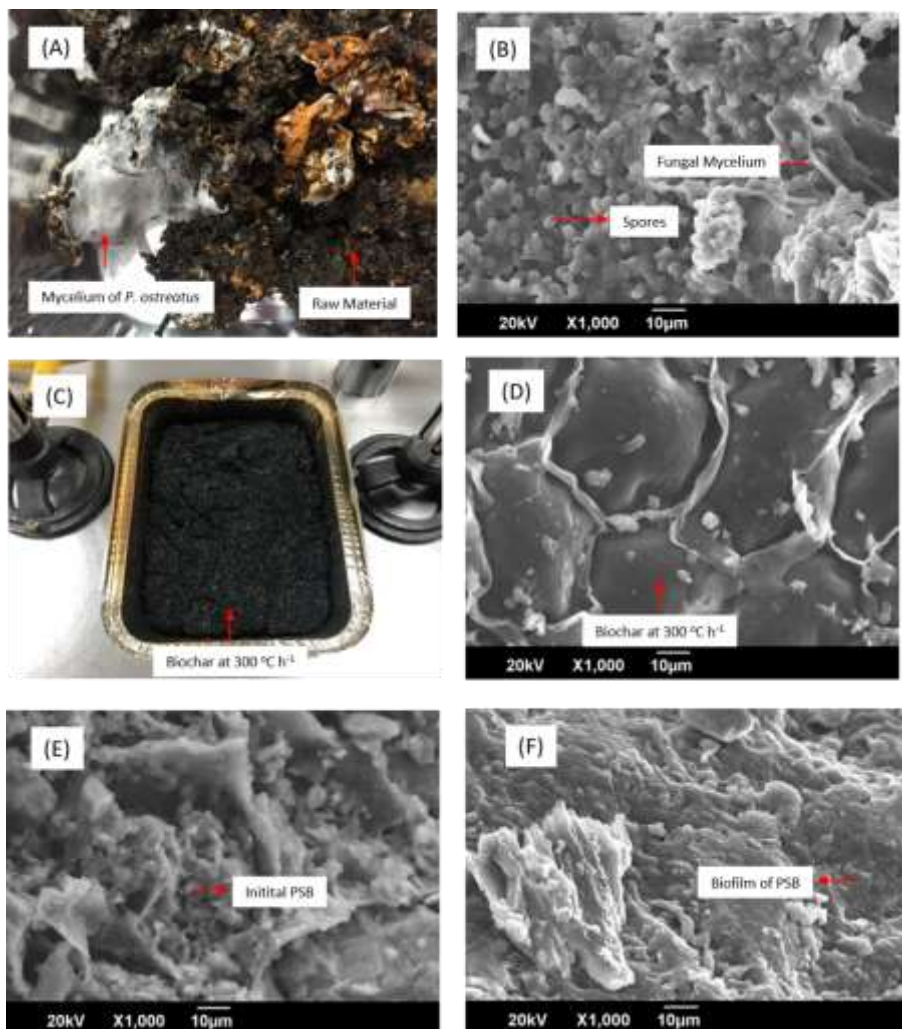


Figura 4.14. Curvas de transformación simultánea de LCB y LDPE_{oxo} pre tratado con plasma en sistemas de microcosmos. (A) RM. (B) RM at MEB 1000x. (C) BC at 300° C/1 h (D) MEB of BC/I 300. (E). BC/I con BPS. (F) BC después de 24 h/ 30° C.

4.7.2. Ensayos de crecimiento de *Allium cepa* L. en invernadero.

La adición de diferentes porcentajes de BC enriquecido con BPS favorecieron el incremento (cm) de la altura de las plántulas de *A. cepa* L. y el incremento en el peso (mg), siendo el mejor tratamiento T3, en el cual se evaluó BC al 5 % (p/p) enriquecido con BPS. Para este tratamiento se obtuvieron valores de 58 mg y 12 cm a las 5 semanas de evaluación ($p=0,0010$ y $p=0,0023$). Para T1 y T2 los resultados fueron 35 mg, 6,1 cm y 38 mg, 7,8 cm, respectivamente. En los controles con sólo suelo (C1), BC con BPS sin suelo (C2), sólo BPS (C3) y BC sin BPS ni suelo (C4) se observó el incremento en el peso y en la altura de las plantas, pero fueron menores que los observados en los tratamientos (Tabla 4.11). Lo que demuestra que la adición de BC

enriquecido con BPS al suelo puede ser una estrategia para favorecer el crecimiento de las plántulas de *A. cepa* L.

Tabla 4.11. Resultados del experimento en semillero empleando semillas de *Allium cepa* por un período de 5 semanas sembradas en diferentes concentraciones de BC y suelo agrícola

Código	Tratamientos	pH	Log ₁₀ BPS g ⁻¹	Peso fresco (mg)	Altura (cm)
1	BC300 1 % (p/v) + BPS+ Suelo	6,4 ± 0,1 ^c	8,3 ± 0,2 ^a	35 ± 3,5 ^b	6,1 ± 0,3 ^b
2	BC300 2 % (p/v) + BPS+ Suelo	6,3 ± 0,2 ^c	8,1 ± 0,2 ^a	38 ± 1 ^b	7,8 ± 0,3 ^b
3	BC300 5 % (p/v) + BPS+ Suelo	6,7 ± 0,6 ^c	8,1 ± 0,8 ^a	58 ± 1 ^a	12 ± 0,4 ^a
C1	Suelo al 100%	5,2 ± 0,2 ^d	5,4 ± 1,2 ^c	18,4 ± 4,9 ^d	3,9 ± 0,2 ^d
C2	BC300 al 100 % (p/v) + BPS	8,0 ± 0,1 ^a	6,8 ± 0,2 ^b	25,7 ± 1,5 ^c	5,7 ± 0,6 ^c
C3	Sólo BPS	7,0 ± 0,1 ^b	5,1 ± 0,1 ^c	21,3 ± 6 ^c	4,2 ± 0,3 ^d
C4	BC300 at 100 % (p/v) sin BPS	6,6 ± 0,1 ^c	2,0 ± 0,1 ^e	9,3 ± 2,9 ^e	3,1 ± 0,5 ^e

*Las letras diferentes significan diferencias estadísticas.

4.8. Discusión

Como se mencionó en la metodología y en los resultados, el bio-producto orgánico que se obtuvo de todos los microcosmos a los 75 días de experimentación, se convirtió en el RM para la producción del BC a 300° C/1h. El proceso de transformación térmica hizo que se perdiera, agua, oxígeno, nitrógeno y carbono por volatilización, pero se logró concentrar el carbono estable o fracción fija. Esto ocurrió porque a 300° C se pierde humedad y la lignocelulosa sufre procesos de depolimerización térmica produciendo una matriz de carbono con diferentes grados de aromaticidad [21]. Estos resultados se relacionaron con las relaciones H/O y O/C, las cuales fueron bajas e indicaron que durante el proceso térmico se eliminó agua, oxígeno y se favoreció la producción de carbono aromático estable. Adicionalmente las bajas relaciones O/C también sugieren que la superficie del BC300 es menos polar que el RM y tiende a ser menos hidrofílico [82]. La textura el BC300 producido era porosa, tuvo mayor superficie de contacto y tamaño de partícula más uniforme que el RM. Autores como de Oliveira Mendes *et al.*, (2014) han reportado que el tratamiento térmico de la biomasa puede favorecer la formación de microporos y macroporos, lo cual es muy favorable para la colonización de microorganismos [31]. En relación con las observaciones de SEM el BC300 presentó una estructura en forma de panal de abejas, la cual se forma a estas temperaturas cuando se utilizan residuos de pino, tal y como lo demostró Awad *et al.*, (2018) en su trabajo al emplear corteza de pino para producir BC a diferentes

temperaturas; en dicho trabajo evidenciaron una estructura con forma de panal de abejas al producirlo a 300° C y bajo condiciones reducidas de oxígeno [21].

Después de producir el BC se realizó el enriquecimiento con las BPS (BC300/BPS/I) y su respectivo cultivo secundario (BC300/BPS/SC). Los resultados demostraron que el BC a pesar de tener baja hidrofilia, se humectó satisfactoriamente con el bioinoculante líquido (BPS) y se generó un incremento en el porcentaje de humedad, el contenido de OM y carbono orgánico, los cuales son aportados por el cultivo líquido bacteriano (Tabla 4.10); lo que influyó en que el carbono volátil aumentara a 81 %. Por el contrario, el carbono fijo disminuyó porque se adicionaron otros compuestos ricos en nitrógeno y carbono, no relacionados con el carbono aromático y amorfo formado a 300 °C. Un resultado contundente se obtuvo en el análisis elemental, donde se observó un incremento en el contenido de hidrógeno y oxígeno, debido a la hidratación del BC/I. Por este motivo las relaciones molares se incrementaron sustancialmente y el BC/BPS se volvió más hidrofílico. Por otro lado, la superficie hidrofílica, la estructura de paneles, micro y macroporos permitió que se inmovilizara una elevada cantidad de BPS $9,5 \text{ Log}_{10} \text{ BPS g}^{-1}$. No se observó un efecto adverso del BC sobre las BPS y al realizar el cultivo secundario el incremento fue de aproximadamente una unidad logarítmica. Adicionalmente, ninguno de los morfotipos fue eliminado durante el proceso de formulación.

Las plantas de *A. cepa* sembradas con BC300/BPS/SC a dosis bajas (T1, T2 y T3), tuvieron mayor biomasa vegetal que aquellas sembradas en los demás sustratos; el peso y la altura de las plantas fueron significativamente superiores en dosis de 5% de BC300 + BPS ($p= 0,0010$ y $p = 0,0023$), seguidos por dosis de 2 % de BC300 + BPS y 1% de BC300 + BPS, respectivamente. Las altas poblaciones BPS en el BC300/BPS, su disposición en biopelículas en el biomaterial y el recuperar células bacterianas en el sustrato de siembra de los tratamientos que incluyeron el BC/BPS demuestran la bondad del BC obtenido como portador microbiano. *Kosakonia* sp. *Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp. tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el oxálico y el cítrico [114], que además de solubilizar nutrientes como P, Ca y K a partir de diversos materiales, protonan la superficie del BC y disminuyen su capacidad de retención de los cationes solubilizados permitiendo que las raíces de la cebolla los puedan tomar a partir de la fase líquida del sustrato. Autores como Hui *et al.*, (2018) y Alozie *et al.*, (2018), afirman que nutrientes como el amonio, el Ca, el K, el Mg contenidos en el medio de cultivo bacteriano u obtenidos como producto del metabolismo microbiano a partir de fuentes

orgánicas de nitrógeno quedan en la fase acuosa del bioinoculante y junto con el C del BC estimulan el metabolismo de microorganismos de distintos grupos funcionales del suelo con el que se mezcla el BC300 [115,116]. Estos nutrientes pueden también ser tomados directamente por las raíces vegetales. De otra parte, a diferencia de lo que ocurre con materiales obtenidos a mayores temperaturas, la rugosidad e hidrofilia del BC300 no favorecen la retención de enzimas como fosfatasas o β -glucosidas por lo que al estimularse la microbiota del suelo y al estar presentes las BPS en el BC300/BPS, la movilidad de nutrientes aumenta y el efecto sobre la altura y la biomasa de *Allium cepa* se ve incrementado. Dentro de los resultados que destacamos en el ensayo de crecimiento vegetal, las dosis bajas evaluadas de la mezcla BC300/BPS y suelo no disminuyen el efecto priming reportado por varios autores al aplicar BC a diferentes suelos, por el contrario, el aporte a la planta de nutrientes contenidos tanto en el material orgánico como en el cultivo bacteriano, que incluye roca fosfórica (32% de CaO), nitratos ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$), P extractible (209 mg L^{-1}) y P soluble en agua (41 mg L^{-1}), explica las diferencias del crecimiento de las plantas en los tratamientos y en los controles [21,26,82,96].

Los resultados de esta investigación indican lo promisorio de realizar el tratamiento simultáneo de LCB y LDPE_{oxo} (plasma treated), empleando a *P. ostreatus* bajo condiciones mesofílicas y aeróbicas a escala de microcosmos. Este sistema favoreció el crecimiento de *P. ostreatus* al reunir una composición rica en material lignocelulósico, sustrato para las enzimas ligninolíticas del hongo, en especial la LiP la cual presentó la mayor actividad enzimática al día 75 y que favoreció la biotransformación de las láminas de LDPE_{oxo} (tratado con plasma). La biotransformación de los dos residuos se pudo realizar debido al cometabolismo entre sustratos y fue influenciado por la producción de las enzimas ligninolíticas y la producción de biomasa. Uno de los bioproductos obtenidos se convirtió en un soporte para la inmovilización de BPS y se demostró su uso potencial como biofertilizante orgánico en presentación sólida.

4.9. Conclusión

El estudio anterior realizado con Moreno-Bayona *et al.*, (2019), en donde se evaluó el efecto de un bioproducto que en su formulación contenía biochar de aserrín de pino caribe (APC) y coinoculado con el bioinoculante producido en el capítulo 3, en semillas de cebolla cabezona *Allium cepa* L., permitió concluir que al ser aplicado se favorece el peso (mg) y la longitud (cm) de las plantas que se cultivaron en suelo con 5% de biofertilizante, siendo este el mejor

tratamiento con respecto a los demás evaluados. El bioproducto obtenido se convirtió en un sustrato para la inmovilización de BPS, demostrando un uso potencial como biofertilizante orgánico sólido.[32].

4.10. Productos científicos derivados del objetivo específico 2

4.10.1. Artículos científicos

Como productos derivados de la sección 1 se está preparando un artículo que integra algunos resultados de los capítulos 3, 4 y 5. Este artículo se encuentra en proceso de escritura y la cita preliminar se presenta a continuación.

Sección 1: Blanco-Vargas A, Chacon MA, Quintero-Duque MC, Poutou-Piñales RA, Diaz-Ariza LA, Devia CE, Castillo-Carvajal LC, Toledo-Aranda D, Matos C, Olaya W, Pedroza-Rodríguez AM. Biochar production from caribbean pine sawdust as alternative for the phosphate solubilizing bacteria co-inoculation; and evaluation in *Allium cepa* L. crop. *In writing*

Los resultados de la sección 2 del capítulo 4 fueron publicados en el año 2019 en la revista PLoS ONE. La referencia correspondiente se presenta a continuación.

Sección 2: Moreno-Bayona DA, Gómez-Méndez LD, Blanco-Vargas A, Castillo-Toro A, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, et al. Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by *Pleurotus ostreatus* for biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use. *PLoS ONE*. 2019;14: 25. doi:10.1371/journal.pone.0217100

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by *Pleurotus ostreatus* for biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use

Diana A. Moreno-Bayona^{1,2*}, Luis D. Gómez-Méndez^{1,2,3*}, Andrea Blanco-Vargas^{1,4*}, Alejandra Castillo-Toro⁵, Laura Herrera-Carlosama¹, Raúl A. Poutou-Piñales⁶, Juan C. Salcedo-Reyes⁶, Lucía A. Díaz-Ariza¹, Laura C. Castillo-Carvajal⁶, Naydú S. Rojas-Higuera⁶, Aura M. Pedroza-Rodríguez⁶

1 Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia, 2 Laboratorio de Biotecnología Molecular, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia, 3 Laboratorio de Películas Delgadas y Nanofotónica, Departamento de Física, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia, 4 Laboratorio Asociaciones Suelo-Planta Microorganismos (LAMIC), Grupo de Investigación en Agricultura Biológica, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia, 5 Facultad de Ciencias, Universidad Anahuac de México, México, D.F., México, 6 Facultad de Ciencias, Fundación Universitaria Agraria de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

* These authors contributed equally to this work.
* andrea@javeriana.edu.co

OPEN ACCESS

Citation: Moreno-Bayona DA, Gómez-Méndez LD, Blanco-Vargas A, Castillo-Toro A, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, et al. (2019) Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by *Pleurotus ostreatus* for biochar production.

Check for updates

4.10.2. Formación de talento humano: Trabajos de Grado de pregrado codirigidos, asociados al objetivo específico 2

- Chacón MA. Producción y evaluación de un biochar a base de aserrín de pino caribe como soporte orgánico para inmovilizar bacterias fosfato solubilizadoras. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 2019.

4.10.3. Participación en eventos científicos

- Participación en modalidad de poster en el XLI Encuentro Nacional de La Ingeniería Química, el Desarrollo Nacional y la Responsabilidad Social, de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. AMIDIQ. Evento que se llevó a cabo del 22 al 24 de octubre de 2020 en la ciudad de Ixtapa Zihuatanejo, Gro., México.



4.11. Referencias

1. Decreto 1532 de 2019. Bogota, Colombia; 2019.
2. ONF Andina. Estudios de Economía forestal en el marco de la Misión de Crecimiento Verde en Colombia. Bogota, Colombia; 2018.
3. Rojas Higuera NS, Pava Sánchez AM, Pinzón Rangel DL, Díaz Ariza LA, Quevedo Hidalgo B, Pedroza Rodríguez AM. Bio-transformed sawdust by white rot fungi used as a carrier for plant growth-promoting bacteria. *European Journal of Wood and Wood Products*. 2016;75: 263–273. doi:10.1007/s00107-016-1099-x
4. Refocosta. Informe de Monitoreo Reforestadora de la Costa S.A.S. Bogota, Colombia; 2018.
5. Dessbesell L, Xu C, Pulkki R, Leitch M, Mahmood N. Forest biomass supply chain optimization for a biorefinery aiming to produce high-value bio-based materials and chemicals from lignin and forestry residues: A review of literature. *Canadian Journal of Forest Research*. 2017;47: 277–288. doi:10.1139/cjfr-2016-0336
6. Hernández J, Villanueva S, Henríquez M. Tech Note: Transforming waste into energy, Part I. *Revista Ciencia en Revolución*. 2019;5: 81–91. doi:2610–8216
7. Collard FX, Blin J. A review on pyrolysis of biomass constituents: Mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014;38: 594–608. doi:10.1016/j.rser.2014.06.013
8. Brebu M, Vasile C. Thermal degradation of lignin - A review. *Cellulose Chemistry and Technology*. 2010;44: 353–363.
9. Porkcolombia. Por una porcicultura ambiental - Kit de cartillas ambientales. Bogota, Colombia; 2017.
10. Salej Vargas PA, Blanco Vargas A, Peña Carranza L, Castillo Carvajal LC, Pedroza Rodríguez AM. Evaluación de *Trichoderma* sp. y bacterias fosfatosolubilizadoras inmovilizadas en biochar como biocontroladores de hongos asociados con la pudrición de *Allium cepa* L. *In writing*. 2020.
11. Rojas Higuera NS. Biotransformación y bioenriquecimiento de residuos de aserrio. *Tesis Maestría en Ciencias Biológicas*. Bogota, Colombia; 2013.
12. Pedroza A, Diaz LA. Producción de sustratos bio enriquecidos para propagación de material vegetal en vivero empleando subproductos de madera de pino, eucalipto, teca y roble. Informe técnico final proyecto de investigación. Bogota, Colombia; 2011.
13. Pedroza A, Diaz LA. Optimización de estrategias de siembra de materiales forestales con el uso de sustratos biotransformados enriquecidos con microorganismos benéficos.

Informe técnico final proyecto de investigación. Bogota, Colombia; 2013.

14. Kan T, Strezov V, Evans TJ. Lignocellulosic biomass pyrolysis: A review of product properties and effects of pyrolysis parameters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016;57: 1126–1140. doi:10.1016/j.rser.2015.12.185
15. Kumar R, Strezov V, Weldekidan H, He J, Singh S, Kan T, et al. Lignocellulose biomass pyrolysis for bio-oil production: A review of biomass pre-treatment methods for production of drop-in fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020;123: 109763. doi:10.1016/j.rser.2020.109763
16. Cha JS, Park SH, Jung SC, Ryu C, Jeon JK, Shin MC, et al. Production and utilization of biochar: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2016;40: 1–15. doi:10.1016/j.jiec.2016.06.002
17. Tripathi M, Sahu JN, Ganesan P. Effect of process parameters on production of biochar from biomass waste through pyrolysis: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016;55: 467–481. doi:10.1016/j.rser.2015.10.122
18. Thevenot M, Dignac MF, Rumpel C. Fate of lignins in soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry*. 2010;42: 1200–1211. doi:10.1016/j.soilbio.2010.03.017
19. Munk L, Sitarz AK, Kalyani DC, Mikkelsen JD, Meyer AS. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnology Advances*. 2015;33: 13–24. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.008
20. Yang X, Zhang S, Ju M, Liu L. Preparation and modification of biochar materials and their application in soil remediation. *Applied Sciences*. 2019;9. doi:10.3390/app9071365
21. Awad YM, Ok YS, Abrigata J, Beiyuan J, Beckers F, Tsang DCW, et al. Pine sawdust biomass and biochars at different pyrolysis temperatures change soil redox processes. *Science of the Total Environment*. 2018;625: 147–154. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.194
22. Kavitha B, Laxma Reddy PV, Kim B, Lee SS, Pandey SK, Kim KH. Benefits and limitations of biochar amendment in agricultural soils: A review. *Journal of Environmental Management*. 2018;227: 146–154. doi:10.1016/j.jenvman.2018.08.082
23. International Biochar Initiative. Standardized product definition and product testing guidelines for biochar that is used in soil. 2012.
24. Jeffery S, Verheijen FGA, van der Velde M, Bastos AC. A quantitative review of the effects of biochar application to soils on crop productivity using meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2011;144: 175–187. doi:10.1016/j.agee.2011.08.015
25. Beesley L, Moreno-Jiménez E, Gomez-Eyles JL, Harris E, Robinson B, Sizmur T. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. *Environmental Pollution*. 2011;159: 3269–3282. doi:10.1016/j.envpol.2011.07.023

26. Fox A, Kwapinski W, Griffiths BS, Schmalenberger A. The role of sulfur- and phosphorus-mobilizing bacteria in biochar-induced growth promotion of *Lolium perenne*. *FEMS Microbiology Ecology*. 2014;90: 78–91. doi:10.1111/1574-6941.12374
27. Egamberdieva D, Wirth S, Behrendt U, Abd-Allah EF, Berg G. Biochar treatment resulted in a combined effect on soybean growth promotion and a shift in plant growth promoting rhizobacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00209
28. Harel YM, Elad Y, Rav-David D, Borenstein M, Shulchani R, Lew B, et al. Biochar mediates systemic response of strawberry to foliar fungal pathogens. *Plant Soil*. 2012;357: 245–257. doi:10.1007/s11104-012-1129-3
29. Mehari ZH, Elad Y, Rav-David D, Graber ER, Meller Harel Y. Induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Botrytis cinerea* by biochar amendment involves jasmonic acid signaling. *Plant Soil*. 2015;395: 31–44. doi:10.1007/s11104-015-2445-1
30. Jaiswal AK, Frenkel O, Elad Y, Lew B, Graber ER. Non-monotonic influence of biochar dose on bean seedling growth and susceptibility to *Rhizoctonia solani*: the “Shifted Rmax-Effect.” *Plant Soil*. 2015;395: 125–140. doi:10.1007/s11104-014-2331-2
31. De Oliveira Mendes G, Lopez Zafra D, Bojkov Vassilev N, Ribeiro Silva I, Ribeiro JI, Dutra Costa M. Biochar enhances *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluoride toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014;80: 3081–3085. doi:10.1128/AEM.00241-14
32. Moreno-Bayona DA, Gómez-Méndez LD, Blanco-Vargas A, Castillo-Toro A, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, et al. Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by *Pleurotus ostreatus* for biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use. *PLoS ONE*. 2019;14: 25. doi:10.1371/journal.pone.0217100
33. Hale L, Luth M, Crowley D. Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. *Soil Biology and Biochemistry*. 2015;81: 228–235. doi:10.1016/j.soilbio.2014.11.023
34. Rafique M, Ortas I, Ahmed IAM, Rizwan M, Afridi MS, Sultan T, et al. Potential impact of biochar types and microbial inoculants on growth of onion plant in differently textured and phosphorus limited soils. *Journal of Environmental Management*. 2019;247: 672–680. doi:10.1016/j.jenvman.2019.06.123
35. Siddiqui AR, Nazeer S, Piracha MA, Saleem MM, Siddiqi I, Shahzad SM, et al. The production of biochar and its possible effects on soil properties and phosphate solubilizing bacteria. *Journal of Arid Agriculture and Biotechnology*. 2016;1: 27–40. doi:2415-6736
36. Garcia Salazar MF. Efecto de condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad química, física y microbiológica de un sustrato orgánico para viveros. Pontificia Universidad Javeriana. 2018.

37. Behera BC, Yadav H, Singh SK, Mishra RR, Sethi BK, Dutta SK, et al. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15: 169–178. doi:10.1016/j.jgeb.2017.01.003
38. Tahir M, Khalid U, Ijaz M, Shah GM, Naeem MA, Shahid M, et al. Environmental Microbiology Combined application of bio-organic phosphate and phosphorus solubilizing bacteria (*Bacillus strain* MWT 14) improve the performance of bread wheat with low fertilizer input under an arid climate. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018;49S: 15–24. doi:10.1016/j.bjm.2017.11.005
39. Wei Y, Zhao Y, Shi M, Cao Z, Lu Q, Yang T, et al. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*. 2018;247: 190–199. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.092
40. Blanco-Vargas A, Rodriguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Garzon-Jaramillo R, Rivera-Hoyos CM, Díaz-Ariza LA, et al. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*. 2020a;6: e05218. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05218
41. Vassilev N, Vassileva M, Fenice M, Federici F. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Bioresource Technology*. 2001;79: 263–271. doi:10.1016/S0960-8524(01)00017-7
42. Blanco-Vargas A, Rodriguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, Diaz-Ariza LA, et al. Effect of bioinoculant (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., and *Kosakonia* sp.) on *Allium cepa* L. at plot scale. *Universitas Scientiarum*. 2020b. doi:In review
43. Parastesh F, Alikhani A, Etesami H. Vermicompost enriched with phosphatesolubilizing bacteria provides plant with enough phosphorus in a sequential cropping under calcareous soil conditions. *Journal of Cleaner Production*. 2019;221: 27–37. doi:10.1016/j.jclepro.2019.02.234
44. Zambrano-Moreno DC, Ramón-Rodríguez LF, Strahlen-Pérez M Van, Bonilla-Buitrago RR. Bioinoculants industry for agricultural use in Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 2015;18: 59–67.
45. Herrera-Carlosama L. Evaluación de un biofertilizante a base de bacterias fosfato solubilizadoras en presentación líquida y sólida sobre el crecimiento de *Allium cepa* L. Pontificia Universidad Javeriana. 2019.
46. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana NTC 5167. Productos para la industria agrícola. Productos orgánicos usados como abonos o fertilizantes y enmiendas o acondicionadores de suelo. Bogota, Colombia; 2011.
47. Gavande SA. Física de suelos: principios y aplicaciones. 1ra Edició. Mexico D.F.: Limusa; 1991.

48. Gondar D, Lopez R, Fiol S, Antelo JM, Arce F. Characterization and acid-base properties of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog. *Geoderma*. 2005;126: 367–374. doi:10.1016/j.geoderma.2004.10.006
49. Martinez M, Martinez P, Franco M, Cardenas M. Manual de Laboratorio Microbiología Ambiental. Bogota, Colombia: Centro Editorial Javeriano; 2003.
50. American Association of State Highway and Transportation Official. Standard Method of Test for Determination of Organic Content in Soils by Loss on Ignition. AASHTO Designation: T 267-86 (2008). 2008.
51. Paramashivam D, Clough TJ, Dickinson NM, Horswell J, Lense O, Clucas L, et al. Effect of Pine Waste and Pine Biochar on Nitrogen Mobility in Biosolids. *Journal of Environment Quality*. 2015;45: 360. doi:10.2134/jeq2015.06.0298
52. Zhang H, Voroney RP, Price GW. Effects of temperature and processing conditions on biochar chemical properties and their influence on soil C and N transformations. *Soil Biology and Biochemistry*. 2015;83: 19–28. doi:10.1016/j.soilbio.2015.01.006
53. Tran KQ, Alonso MZ, Wang L, Skreiberg Ø. Simultaneously Boosting the Mass and Fixed-carbon Yields of Charcoal from Forest Residue via Atmospheric Carbonization. *Energy Procedia*. 2017;105: 787–792. doi:10.1016/j.egypro.2017.03.390
54. Yang X, Wang H, Strong PJ, Xu S, Liu S, Lu K, et al. Thermal properties of biochars derived from Waste biomass generated by agricultural and forestry sectors. *Energies*. 2017;10. doi:10.3390/en10040469
55. De Bhowmick G, Sarmah AK, Sen R. Production and characterization of a value added biochar mix using seaweed, rice husk and pine sawdust: A parametric study. *Journal of Cleaner Production*. 2018;200: 641–656. doi:10.1016/j.jclepro.2018.08.002
56. Gonzalez-Osorio H, Sadeghian-Khalajabadi S, Zapata-Hernández RD, Mejía-Muñoz B. Fraccionamiento de la materia orgánica en suelos de la zona cafetera de Caldas. *Cenicafé*. 2008;59: 310–320.
57. Lou K, Rajapaksha AU, Ok YS, Chang SX. Pyrolysis temperature and steam activation effects on sorption of phosphate on pine sawdust biochars in aqueous solutions. *Chemical Speciation and Bioavailability*. 2016;28: 42–50. doi:10.1080/09542299.2016.1165080
58. Shaaban A, Se SM, Dimin MF, Juoi JM, Mohd Husin MH, Mitan NMM. Influence of heating temperature and holding time on biochars derived from rubber wood sawdust via slow pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2014;107: 31–39. doi:10.1016/j.jaap.2014.01.021
59. Poutou Piñales R, Amador Martínez E, Candelario Frontela M. Banco de células primario (BCP): caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Biotecnología aplicada*. 1994;11: 55–59.
60. Murphy J, Riley JP. A single-solution method for the determination of soluble phosphate

in sea water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1958.

61. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana NTC 5842 de 2018: Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Bogotá, Colombia; 2018.
62. Díaz LA, Morales Palencia LM, Beltrán Acosta JS. Inoculante biológico para la promoción de crecimiento de las especies forestales y método para su obtención. Colombia; WO 2014/167409 A1, 2014. p. 36.
63. Marín Pensantes DG. Evaluación de la remoción del ibuprofeno mediante biosorción en tallos de rosas y posos de café. Universidad de Cuenca. 2017.
64. Morales-Álvarez ED, Rivera-Hoyos CM, Chaparro-Núñez LE, Daza CE, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM. Decolorization and Detoxification of Malachite Green by *Ganoderma lucidum*: Key Operating Parameters and Adsorption Studies. *Journal of Environmental Engineering*. 2016;143: 1–12. doi:10.1061/(asce)ee.1943-7870.0001180
65. Mohammed NAS, Abu-Zurayk RA, Hamadneh I, Al-Dujaili AH. Phenol adsorption on biochar prepared from the pine fruit shells: Equilibrium, kinetic and thermodynamics studies. *Journal of Environmental Management*. 2018;226: 377–385. doi:10.1016/j.jenvman.2018.08.033
66. Ho Y-S. Review of second-order models for adsorption systems. *Journal of Hazardous Materials*. 2006;136: 681–689. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.12.043
67. Low MJD. Kinetics of chemisorption of gases on solids. *Chemical Reviews*. 1960;60: 267–312. doi:10.1021/cr60205a003
68. Oladoja NA, Aboluwoye CO, Oladimeji YB. Kinetics and isotherm studies on Methylene Blue adsorption onto ground palm kernel coat. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*. 2008;32: 303–312. doi:10.3906/sag-1301-71
69. John M. Colorimetric determination of phosphorus in soil and plant materials with ascorbic acid. *Soil Science*. 1970;109: 214–220.
70. Cuellar-Bermudez SP, Aleman-Nava GS, Chandra R, Garcia-Perez JS, Contreras-Angulo JR, Markou G, et al. Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. *Algal Research*. 2017;24: 438–449. doi:10.1016/j.algal.2016.08.018
71. Chacón MA. Producción y evaluación de un biochar a base de aserrín de pino caribe como soporte orgánico para inmovilizar bacterias fosfato solubilizadoras. Pontificia Universidad Javeriana. 2019.
72. Ponnusamy VK, Nguyen DD, Dharmaraja J, Shobana S, Banu JR, Saratale RG, et al. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresource Technology*. 2018;271: 462–472. doi:10.1016/j.biortech.2018.09.070
73. Chang G, Huang Y, Xie J, Yang H, Liu H, Yin X, et al. The lignin pyrolysis composition

and pyrolysis products of palm kernel shell, wheat straw, and pine sawdust. *Energy Conversion and Management*. 2016;124: 587–597. doi:10.1016/j.enconman.2016.07.038

74. Liu Z, Zhang F, Yan S, Tian L, Wang H, Liu H, et al. Effects of temperature and low-concentration oxygen on pine wood sawdust briquettes pyrolysis: Gas yields and biochar briquettes physical properties. *Fuel Processing Technology*. 2018;177: 228–236. doi:10.1016/j.fuproc.2018.05.001
75. Kalayu G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*. 2019. doi:10.1155/2019/4917256
76. Štefelová J, Zelenka T, Slovák V. Biosorption (removing) of Cd(II), Cu(II) and methylene blue using biochar produced by different pyrolysis conditions of beech and spruce sawdust. *Wood Science and Technology*. 2017;51: 1321–1338. doi:10.1007/s00226-017-0928-3
77. Zheng B-X, Ding K, Yang X-R, Wadaan MAM, Hozzein WN, Peñuelas J, et al. Straw biochar increases the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacterial community for better rape (*Brassica napus*) growth and phosphate uptake. *Science of the Total Environment*. 2019;647: 1113–1120. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.454
78. Liu L, Deng G, Shi X. Adsorption characteristics and mechanism of p-nitrophenol by pine sawdust biochar samples produced at different pyrolysis temperatures. *Scientific Reports*. 2020;10: 1–11. doi:10.1038/s41598-020-62059-y
79. Haddad K, Jeguirim M, Jellali S, Thevenin N, Ruidavets L, Limousy L. Biochar production from Cypress sawdust and olive mill wastewater: Agronomic approach. *Science of the Total Environment*. 2021;752: 141713. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141713
80. Igalavithana AD, Choi SW, Shang J, Hanif A, Dissanayake PD, Tsang DCW, et al. Carbon dioxide capture in biochar produced from pine sawdust and paper mill sludge: Effect of porous structure and surface chemistry. *Science of the Total Environment*. 2020;739: 139845. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139845
81. Li D, Yin F, Ma X. Achieving valorization of fermented activated sludge using pretreated waste wood feedstock for volatile fatty acids accumulation. *Bioresour Technol*. 2019;290: 121791. doi:10.1016/j.biortech.2019.121791
82. Ahmad M, Lee SS, Rajapaksha AU, Vithanage M, Zhang M, Cho JS, et al. Trichloroethylene adsorption by pine needle biochars produced at various pyrolysis temperatures. *Bioresour Technol*. 2013;143: 615–622. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.033
83. Zhu M, Zhou W, Zhang Z, Li J, Zhang D. Effect of Temperature on Pyrolysis Products of a Pine Sawdust in an Indirectly Fired Rotary Kiln. 2013; 879–884.
84. Lehmann J, Rillig MC, Thies J, Masiello CA, Hockaday WC, Crowley D. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biology and Biochemistry*. 2011;43: 1812–1836. doi:10.1016/j.soilbio.2011.04.022

85. Rafi MM, Krishnaveni MS, Charyulu PBBN. Phosphate-Solubilizing Microorganisms and Their Emerging Role in Sustainable Agriculture. *Soil and agriculture microbiology*. 2019. pp. 223–232. doi:10.1016/B978-0-12-816328-3.00017-9
86. Pukalchik M, Mercl F, Panova M, Břendová K, Terekhova VA, Tlustoš P. The improvement of multi-contaminated sandy loam soil chemical and biological properties by the biochar, wood ash, and humic substances amendments. *Environmental Pollution*. 2017;229: 516–524. doi:10.1016/j.envpol.2017.06.021
87. Kim KH, Kim JY, Cho TS, Choi JW. Influence of pyrolysis temperature on physicochemical properties of biochar obtained from the fast pyrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*). *Bioresource Technology*. 2012;118: 158–162. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.094
88. You Y, Zhao Z, Song Y, Li J, Li J, Cheng X. Synthesis of magnetized nitrogen-doped biochar and its high efficiency for elimination of ciprofloxacin hydrochloride by activation of peroxydisulfate. *Separation and Purification Technology*. 2020;258: 117977. doi:10.1016/j.seppur.2020.117977
89. Hockaday WC, Grannas AM, Kim S, Hatcher PG. The transformation and mobility of charcoal in a fire-impacted watershed. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2007;71: 3432–3445. doi:10.1016/j.gca.2007.02.023
90. Sichone K. Pyrolysis of Sawdust. University of Waikato. 2013.
91. Maddi B, Viamajala S, Varanasi S. Comparative study of pyrolysis of algal biomass from natural lake blooms with lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2011;102: 11018–11026. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.055
92. Suarez Hernandez L, Ardila A AN, Barrera Zapata R. Morphological and physicochemical characterization of biochar produced by gasification of selected forestry species. *Revista Facultad de Ingeniería*. 2017;26: 123–130. doi:http://doi.org/10.19053/01211129.v26.n46.2017.7324
93. Jouiad M, Al-Nofeli N, Khalifa N, Benyettou F, Yousef LF. Characteristics of slow pyrolysis biochars produced from rhodes grass and fronds of edible date palm. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2015;111: 183–190. doi:10.1016/j.jaap.2014.10.024
94. Rutherford DW, Wershaw RL, Rostad CE, Kelly CN. Effect of formation conditions on biochars: Compositional and structural properties of cellulose, lignin, and pine biochars. *Biomass and bioenergy*. 2012;46: 693–701. doi:10.1016/j.biombioe.2012.06.026
95. Collins C, Lyne P. *Microbiological Methods*. Eighth Ed. London; 2004.
96. Foster EJ, Fogle EJ, Cotrufo MF. Sorption to biochar impacts β -glucosidase and phosphatase enzyme activities. *Agriculture (Switzerland)*. 2018;8: 1–12. doi:10.3390/agriculture8100158
97. Escalante Rebolledo A, Pérez Lopez G, Hidalgo Moreno C, López Callado J, Campo

- Alves J, Valtierra Pacheco E, et al. Biocarbón (biochar) I: Naturaleza, historia, fabricación y uso en el suelo. *Terra Latinoamericana*. 2016;34: 367–382.
98. Huguet A, Coffinet S, Roussel A, Gayraud F, Anquetil C, Bergonzini L, et al. Evaluation of 3-hydroxy fatty acids as a pH and temperature proxy in soils from temperate and tropical altitudinal gradients. *Organic Geochemistry*. 2019;129: 1–13. doi:10.1016/j.orggeochem.2019.01.002
 99. Nguyen NT. Adsorption Of Phosphorus From Wastewater Onto Biochar: Batch And Fixed-bed Column Studies. Helsinki Metropolia University of Applied Sciences. 2015.
 100. Li R, Wang JJ, Zhou B, Zhang Z, Liu S, Lei S, et al. Simultaneous capture removal of phosphate, ammonium and organic substances by MgO impregnated biochar and its potential use in swine wastewater treatment. *Journal of Cleaner Production*. 2017;147: 96–107. doi:10.1016/j.jclepro.2017.01.069
 101. Huang H, Zhang P, Zhang Z, Liu J, Xiao J, Gao F. Simultaneous removal of ammonia nitrogen and recovery of phosphate from swine wastewater by struvite electrochemical precipitation and recycling technology. *Journal of Cleaner Production*. 2016;127: 302–310. doi:10.1016/j.jclepro.2016.04.002
 102. Li R, Wang JJ, Zhou B, Awasthi K, Ali A, Zhang Z, et al. Enhancing phosphate adsorption by Mg/Al layered double hydroxide functionalized biochar with different Mg/Al ratios. *Science of the Total Environment*. 2016;559: 121–129. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.03.151
 103. Yao Y, Gao B, Inyang M, Zimmerman AR, Cao X, Pullammanappallil P, et al. Removal of phosphate from aqueous solution by biochar derived from anaerobically digested sugar beet tailings. *Journal of Hazardous Materials*. 2011;190: 501–507. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.03.083
 104. Jung KW, Kim K, Jeong TU, Ahn KH. Influence of pyrolysis temperature on characteristics and phosphate adsorption capability of biochar derived from waste-marine macroalgae (*Undaria pinnatifida* roots). *Bioresource Technology*. 2016;200: 1024–1028. doi:10.1016/j.biortech.2015.10.016
 105. Al-Wabel MI, Al-Omran A, El-Naggar AH, Nadeem M, Usman ARA. Pyrolysis temperature induced changes in characteristics and chemical composition of biochar produced from conocarpus wastes. *Bioresource Technology*. 2013;131: 374–379. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.165
 106. Borno ML, Müller-Stöver DS, Liu F. Contrasting effects of biochar on phosphorus dynamics and bioavailability in different soil types. *Science of the Total Environment*. 2018;627: 963–974. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.01.283
 107. Hardie MA, Oliver G, Clothier BE, Bound SA, Green SA, Close DC. Effect of Biochar on Nutrient Leaching in a Young Apple Orchard. *Journal of Environmental Quality*. 2015;44: 1273–1282. doi:10.2134/jeq2015.02.0068

108. Tekeste N, Dechassa N, Woldetsadik K, Dessalegne L, Takele A. Influence of Nitrogen and Phosphorus Application on Bulb Yield and Yield Components of Onion (*Allium Cepa* L.). *Bentham open*. 2018;12: 194–206. doi:10.2174/1874331501812010194
109. Dai L, Li H, Tan F, Zhu N, He M, Hu G. Biochar: a potential route for recycling of phosphorus in agricultural residues. *Global Change Biology Bioenergy*. 2016;8: 852–858. doi:10.1111/gcbb.12365
110. Abd El-Fattah DA, Eweda WE, Zayed MS, Hassanein MK. Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of *Azotobacter chroococcum* inoculant. *Annals of Agricultural Sciences*. 2013;58: 111–118. doi:10.1016/j.aoas.2013.07.001
111. Sun D, Hale L, Crowley D. Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier. *Biology and Fertility of Soils*. 2016;52: 515–522. doi:10.1007/s00374-016-1093-9
112. Hale L, Luth M, Kenney R, Crowley D. Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation. *Applied Soil Ecology*. 2014;84: 192–199. doi:10.1016/j.apsoil.2014.08.001
113. Bei Yuan J, Awad YM, Beckers F, Tsang DCW, Ok YS, Rinklebe J. Mobility and phytoavailability of As and Pb in a contaminated soil using pine sawdust biochar under systematic change of redox conditions. *Chemosphere*. 2017;178: 110–118. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.03.022
114. Oteino N, Lally RD, Kiwanuka S, Lloyd A, Ryan D, Germaine KJ, et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6: 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.00745
115. Hui D, Yu CL, Deng Q, Saini P, Collins K, de Koff J. Weak effects of biochar and nitrogen fertilization on switchgrass photosynthesis, biomass, and soil respiration. *Agriculture (Switzerland)*. 2018;8. doi:10.3390/agriculture8090143
116. Alozie N, Heaney N, Lin C. Biochar immobilizes soil-borne arsenic but not cationic metals in the presence of low-molecular-weight organic acids. *Science of the Total Environment*. 2018;630: 1188–1194. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.02.319
117. Sen Gupta S, Bhattacharyya KG. Kinetics of adsorption of metal ions on inorganic materials: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2011;162: 39–58. doi:10.1016/j.cis.2010.12.004

4.12. Anexos

4.12.1. Estudios de adsorción de las BPS al biochar

De acuerdo con los análisis para los modelos de pseudo primer orden, difusión intrapartícula y difusión en película, los resultados experimentales no ajustaron apropiadamente a estos modelos y no podrán explicar con claridad el fenómeno de adsorción que se está llevando a cabo. Dado que los valores de R^2 fueron bajos y se presente mucha dispersión en los datos experimentales, en especial en largos periodos de adsorción.

Para el modelo de difusión intrapartícula los valores de R^2 estuvieron por debajo de 0,9 para los tres pHs. Por lo tanto, la información que se puede obtener de este modelo es limitada y debe ser analizada con precaución. Aun así, se alcanza a evidenciar una ligera tendencia bilineal de los datos que podrían sugerir que la adsorción se llevó a cabo en dos fases. En la primera se pudo dar una adsorción superficial de las bacterias a los sitios activos del BC. La segunda fase (últimos puntos de muestreo) se pudo llevar a cabo un proceso de difusión intrapartículas. Por otro lado, la bilinearidad de los datos también sugiere posiblemente que el BC tiene diferentes tamaños de poro (macroporos y microporos). Cuando se realiza el tratamiento térmico se disminuye el tamaño de partícula y los diámetros de los poros pueden cambiar por la pérdida de material volátil y reorganización o condensación del carbono (Fig. 4.15 y Tabla 4.12).

Por último, con respecto al modelo de difusión en película líquida para pH de 5,0 (valores de k y R^2 altos) los resultados podrían indicar que al mantener en agitación continua la solución de bacterias y el BC, los microorganismos se difundieron y ubicaron inicialmente en la superficie del adsorbente. Ya que este modelo se usa para describir el flujo del reactante (solución de bacterias) a través del líquido que rodea la superficie del adsorbente (BC) [117]. Para los pH de 5,0 y 8,0 la repulsión de cargas entre las bacterias y el biochar, podría determinar que se formara una multicapa electrónica que disminuye la adsorción.

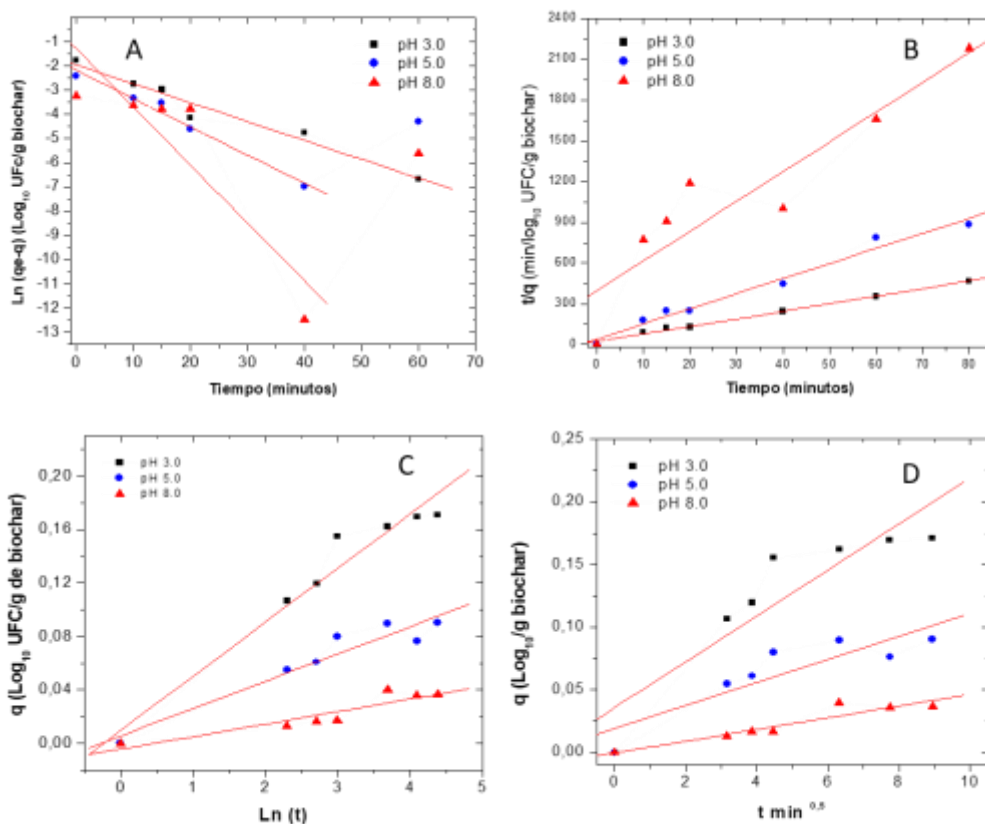


Figura 4.15. Modelos cinéticos de adsorción de PSB al BC. (A) Pseudo primer orden. (B) Difusión intrapartícula. (C) Difusión en películas, para los pHs de 3,0, 5,0 y 8,0.

Tabla 4.12. Parámetros de los modelos cinéticos obtenidos para los estudios de adsorción de PSB al BC

pH	Pseudo-primer orden			Difusion intrapartícula		Difusión en película	
	q_e Log_{10} UFC g^{-1}	k min^{-1}	R^2	k Log_{10} $\text{UFC g}^{-1} \text{min}^{-0.5}$	R^2	K Log_{10} $\text{UFC g}^{-1} \text{min}^{-0.5}$	R^2
pH 3,0	0,140	0,007	0,9671	0,018	0,8012	0,077	0,9615
pH 5,0	0,044	0,044	0,3823	0,009	0,7881	0,044	0,3821
pH 8,0	0,018	0,046	0,1734	0,004	0,8876	0,046	0,1776

Capítulo 5.

Evaluación del efecto del bioinoculante bacteriano y del biofertilizante sobre el crecimiento de *Allium cepa* L.

Tabla de contenido

5.1. Introducción	233
5.2. Materiales y métodos	237
5.2.1. Efecto del bioinoculante sobre la germinación de <i>A. cepa</i> L.....	237
5.2.1.1. Efecto del bioinoculante sobre la germinación de semillas de <i>A. cepa</i> L. en cámara húmeda en laboratorio.....	237
5.2.1.2. Efecto del bioinoculante sobre el crecimiento de <i>Allium cepa</i> L. en semillero.....	238
5.2.2. Evaluación del efecto del bioinoculante y del fertilizante orgánico mineral Abundagro® sobre el crecimiento de <i>Allium cepa</i> L. en parcela	240
5.2.3. Evaluación a nivel de materas del efecto del biofertilizante sobre el crecimiento de <i>A. cepa</i> L.....	243
5.2.3.1. Producción del biofertilizante y control de calidad.....	243
5.2.3.2. Alistamiento de suelo agrícola	245
5.2.3.3. Alistamiento material vegetal.....	245
5.2.3.4. Diseño experimental de bloques completamente al azar para evaluar del efecto del biofertilizante en materas	246
5.3. Resultados	251
5.3.1. Efecto del bioinoculante sobre la germinación de <i>A. cepa</i> L.....	251
5.3.1.1. Efecto del bioinoculante sobre la germinación de semillas de <i>A. cepa</i> L., en cámara húmeda en el laboratorio.....	251
5.3.1.2. Efecto del bioinoculante sobre el crecimiento de <i>A. cepa</i> L., en semillero.....	252
5.3.2. Efecto del bioinoculante y del fertilizante orgánico mineral Abundagro® sobre el crecimiento de <i>A. cepa</i> L. en parcela	254
5.3.3. Efecto del biofertilizante sobre el crecimiento de <i>A. cepa</i> L., en materas	256
5.3.3.1. Efecto del biofertilizante sobre el crecimiento de <i>A. cepa</i> L.....	257
5.3.3.2. Efecto del biofertilizante sobre la composición nutricional del bulbo	258
5.3.3.3. Efecto del biofertilizante sobre el contenido de nutrientes en el suelo	261
5.4. Discusión	267
5.4.1. Efecto del bioinoculante en la germinación de semillas de <i>A. cepa</i> L., en cámara húmeda y crecimiento en semillero.....	267
5.4.2. Efecto del bioinoculante sobre el crecimiento <i>A. cepa</i> L., en parcela	270
5.4.3. Efecto del biofertilizante sobre el crecimiento de <i>A. cepa</i> L., en materas	272
5.5. Conclusiones	277
5.6. Productos científicos derivados del objetivo específico 3	278

5.6.1.	Artículos científicos	278
5.6.2.	Formación de talento humano: Trabajo de Grado de pregrado codirigido, asociado al objetivo específico 3.....	¡Error! Marcador no definido.
5.6.3.	Participación en eventos científicos	279
5.7.	Referencias.....	280
5.8.	Anexos	289
5.8.1.	Saturación de magnesio, potasio y calcio acumulados en bulbo de cebolla	289
5.8.2.	Concentración de nutrientes y pH del suelo después de 4 meses de cultivo en materas	289

5.1. Introducción

El fósforo (P) es uno de los nutrientes inorgánicos esenciales para el crecimiento de las plantas y está implicado en procesos vitales como la fotosíntesis, la respiración, el almacenamiento y transferencia de energía [1,2]. También hace parte de biomoléculas como proteínas, fosfolípidos, coenzimas y ácidos nucleicos [3], por lo que su deficiencia en el suelo, limita el crecimiento de las plantas [4]. Una de las formas de aumentar la concentración de formas disponibles de P para las plantas y suplir el requerimiento de este elemento es a través del uso de fertilizantes de síntesis química durante su cultivo. Sin embargo, debido a la formación de enlaces fuertes con Fe^{3+} y Al^{3+} en suelos ácidos, y con Ca^{2+} y Mg^{2+} en suelos alcalinos, el elemento se precipita formando fosfatos no asimilables [5,6]. La mayoría de los fertilizantes fosfatados inorgánicos se obtienen de roca fosfórica (RP) cuya aplicación con estrategias biotecnológicas mejora la solubilización y la consecuente disponibilidad del elemento en el suelo [7–9].

Debido a que la demanda de fertilizantes fosfatados sigue aumentando y teniendo en cuenta que la RP es un recurso no renovable, se hace necesario el uso de estrategias biotecnológicas económicamente viables que, además, de solubilizar P a partir de dicho material, los solubilice también a partir del suelo y proporcione la disponibilidad del P necesaria para el desarrollo de las plantas [10]. El uso de bacterias fosfato solubilizadoras (BPS) ha sido reportado como una de las formas efectivas para mejorar la solubilización y disponibilidad de P, ya que tienen la capacidad de solubilizar el P inorgánico a través de diferentes mecanismos, dentro de los que se encuentra la producción de ácidos orgánicos cuyas propiedades quelantes favorecen la formación de complejos insolubles con metales, con la consecuente liberación del P y de mineralizar el P orgánico por medio de la producción de enzimas fosfatasas (E.C. 3.1.3), [4,11,12]. En suelo, la solubilización de P por los ácidos orgánicos depende del pH y la mineralogía del mismo. Existen dos mecanismos para que esto ocurra: el primero es un intercambio del ácido, en donde los H^+ provenientes de los ácidos orgánicos producidos por las BPS se intercambian por el P ligado a la superficie de los cristales de Fe^{3+} , Al^{3+} , Ca^{2+} o Mg^{2+} según el pH del suelo, reduciéndolos y liberando el P soluble. El segundo mecanismo es dependiente de los ácidos orgánicos producidos por las BPS en los que la cantidad, el efecto quelante y el tipo de ácidos orgánicos liberados varía con el tipo de microorganismo, y el proceso consiste en la quelación de cationes unidos al P por medio de los grupos hidroxilo y carboxilo

presentes en los ácidos que liberan P soluble [13]. Un mecanismo adicional incluye extrusión de H^+ con la consecuente reducción del pH del medio. El protón liberado desde el citoplasma a la superficie externa puede suceder a cambio de una captación de catión (especialmente amonio) o con la ayuda de la translocación de ATPasa, que se encuentra en la membrana plasmática y utiliza la energía de la hidrólisis de ATP [14,15]. Los procesos de solubilización y de mineralización, no sólo generan movilización del P aplicado en fertilizantes de baja solubilización, sino también del P acumulado en el suelo, disminuyendo el costo de fertilización [16], mejorando la calidad del suelo y contribuyendo a reestablecer su equilibrio ecológico [5].

Bacterias como *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Enterobacter* sp. [12,16–19], son microorganismos con potencial para solubilizar P, a través de la producción de ácidos orgánicos como ácido acético, málico, láctico, succínico, oxálico, glucónico y cítrico. Adicionalmente, la producción de enzimas fosfatasas contribuye al incremento de la liberación del nutriente a partir de fuentes orgánicas [2,4,20,21]. El desarrollo de productos biológicos basados en estos microorganismos es una alternativa al uso de productos de síntesis química al disminuir la cantidad de fertilizante químico aplicado y al mismo tiempo solubilizar el P presente en el suelo y en los minerales asociados [2,22].

Por otra parte, el cultivo de *A. cepa* L. o cebolla de bulbo es de gran importancia en el mundo, pues es uno de los alimentos primordiales de la canasta familiar como condimento y saborizante de las comidas [23–25]. Nutricionalmente la cebolla de bulbo aporta K^+ , P, Na^+ y Ca^{2+} , contiene importantes proteínas, vitaminas como A, B y C, y apreciables cantidades de azúcares y almidón [26,27]. Según la Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA), durante el año 2015 en Colombia se produjeron 196.920 toneladas de cebolla de bulbo [28]. Según datos de la FAO (2018) reportados por Enciso *et al.*, (2019), la producción de cebolla cabezona a nivel mundial fue de 93.168.548 toneladas. En América del Sur, los mayores productores son Brasil, Argentina, Perú y Colombia [25].

Algunos de los problemas identificados para el cultivo de *A. cepa* L. y el sector hortícola en general, son los altos costos de producción y la disminución en la calidad de los suelos debido a la aplicación empírica de fertilizantes sólidos de origen inorgánico que generalmente son suministrados sin realizar un diagnóstico nutricional integral previo, causando acumulación de

nutrientes [29]. El fósforo (P) ocupa el segundo lugar después del nitrógeno como uno de los macronutrientes esenciales que necesitan las plantas y sólo puede ser tomado de la solución del suelo en forma de iones de P (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) [30,31]. La mayor parte del P (95 % - 99 %) presente en el suelo está en forma insoluble y por lo tanto, no puede ser utilizado por las plantas debido a la fijación química en el suelo y su interacción con otros elementos metálicos presentes en el área de la rizósfera [30].

En la producción de *Allium cepa* L., la limitación de fósforo en diferentes etapas (semilleros y parcela) es un factor nutricional que afecta el crecimiento, productividad y rendimiento de los cultivos [10,31,32]. La razón es que en suelos con pH ácido los iones ortofosfato se unen a otros elementos como hierro y aluminio [33]. Por el contrario, a pH alcalino los iones ortofosfato se unen a elementos como calcio y magnesio, determinando que no esté disponible para las plantas de *A. cepa* L. ; el rango óptimo de pH para la solubilización oscila entre 6,5 y $7,0 \pm 0,2$ [33,34]. Por otro lado, el contenido de materia orgánica en estos suelos es bajo y afecta directamente la relación C/N/P, que es la responsable de regular la dinámica del ciclo P asociado con los procesos de mineralización, inmovilización o solubilización [33].

Por estas razones, se buscan alternativas biotecnológicas con aplicación agrícola sostenible como el uso de biochar obtenido a partir de residuos forestales y BPS [31,32,35,36]. Este biomaterial podría emplearse en mezcla con fertilizantes inorgánicos (NPK) u orgánicos (compost y vermicompost) en diferentes dosis y de esta forma se disminuiría el uso excesivo de fertilizantes químicos como únicas fuentes de fósforo [6,10,37,38]. Un creciente interés en el aprovechamiento beneficioso del biochar (BC) ha incrementado el interés para la agricultura, en relación con su beneficio para el manejo sostenible del suelo [39]. La producción de BC y su aplicación como soporte de BPS para la producción de un biofertilizante en presentación sólida en el suelo han mostrado resultados prometedores para la producción de cultivos ya que mejora de la calidad del suelo y mejora las propiedades físicas para favorecer el establecimiento de microorganismos benéficos [40]. El biochar por si sólo también puede ser una fuente adicional del fósforo, porque durante su proceso de producción y dependiendo del tipo de materia prima, puede contener concentraciones variables de fósforo [31,41], convirtiéndose en una estrategia amigable con el medio ambiente, ya que integra el uso, transformación y aprovechamiento de un

residuo forestal, con la aplicación de microorganismo benéficos (BPS) en hortalizas como *A. cepa* L. y generando un efecto benéfico combinado en el suelo y en las plantas [10,31,33,36,40].

La primera parte del presente Capítulo está relacionada con la evaluación del efecto del bioinoculante a base de BPS (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.) producido en el medio MT11B, sobre la germinación de semillas de *A. cepa* L. (en cámara húmeda en laboratorio), sobre el crecimiento de *A. cepa* L. en semillero (numeral 5.2.1) y en parcela en el municipio de Tópaga (Boyacá, Colombia) en combinación con fertilizante orgánico mineral Abundagro® (numeral 5.2.2). El desarrollo y producción del bioinoculante se describió en el Capítulo 3.

La segunda parte del presente Capítulo está asociada a la evaluación del efecto del biofertilizante a base de BC y BPS (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.) (BC/BPS) sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en materas (numeral 5.2.3), el proceso de producción del biofertilizante se presentó en el Capítulo 4. Como producto derivado se encuentra en escritura un artículo científico en el que se reportarán los resultados de la producción de un BC a partir de aserrín de pino caribe (APC) como alternativa de aprovechamiento de subproductos de aserrío para la coinoculación de BPS (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.) y su evaluación en *Allium cepa* L.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Efecto del bioinoculante sobre la germinación de *A. cepa* L.

Estos experimentos, se realizaron en dos etapas. La primera asociada con el porcentaje de germinación de semillas en el laboratorio y la segunda etapa correspondió al establecimiento del cultivo en semillero. Para el ensayo se utilizaron semillas de cebolla de bulbo o *A. cepa* L., de la variedad Granex estándar.

5.2.1.1. Efecto del bioinoculante sobre la germinación de semillas de *A. cepa* L. en cámara húmeda en laboratorio

Para determinar el porcentaje de germinación se tomaron 20 semillas de *A. cepa* y se colocaron por triplicado en cajas de Petri de 9,0 cm de diámetro que contenían papel de filtro Whatman No 3. A cada caja de Petri se le añadieron 5 mL de suspensión de consorcio, cocultivo y cada cepa por separado (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.), cultivadas en caldo MT11B, con concentración final de 8,0 Log₁₀ UFC mL⁻¹. Como controles se utilizaron agua destilada y el medio MT11B estéril diluido 1/1000 para lograr la dosis de aplicación de los productos biológicos [42]. El proceso de producción del bioinoculante se presentó en el [Capítulo 3](#). Las cajas de Petri de consorcio, cocultivo, cepas por separado y controles se incubaron por 5 días a 20 °C en oscuridad; momento en el cual, se determinó el número de semillas germinadas por emergencia de la radícula de la testa (3 mm) [43]. Luego, se determinó el porcentaje de germinación [44]. La [Fig. 5.1](#) presenta el resumen grafico de los ensayos de germinación en cámara húmeda en laboratorio. Con los datos obtenidos se determinaron la media, DS y diferencias significativas entre consorcio, cocultivo, cepas por separado y controles sobre las semillas. Se usó el programa estadístico SAS® (SAS Institute 2017. versión STAT 9.0. Cary, NC: SAS Institute).

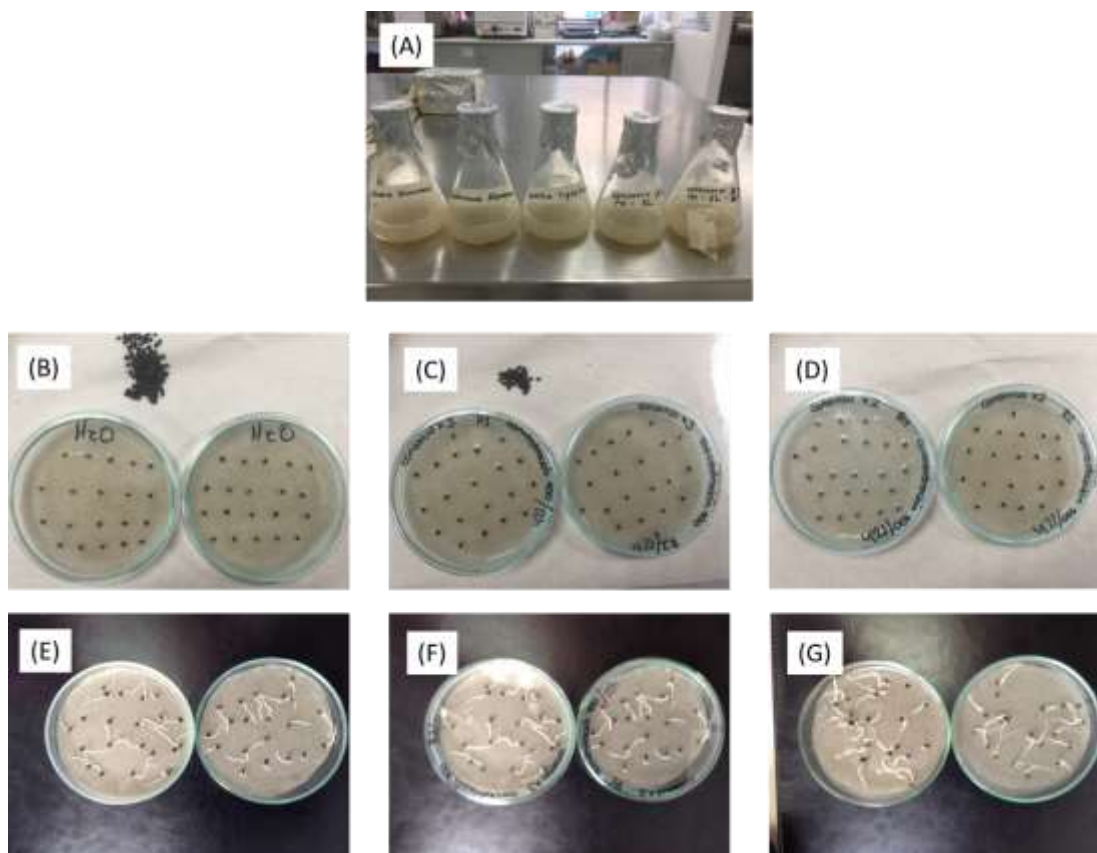


Figura 5.1. Ensayos de germinación en cámara húmeda en laboratorio a 19 ± 2 °C. (A) Inóculos producidos en medio MT11B. (B) Semillas de *A. cepa* L., en agua. (C) Semillas de *A. cepa* L., en el momento de la inoculación con el consorcio. (D) Semillas de *A. cepa* L., en el momento de la inoculación con el cocultivo. (E) Semillas de *A. cepa* L., germinadas a los 5 días con agua. (F) Semillas de *A. cepa* L., germinadas a los 5 días con el consorcio, (G) Semillas de *A. cepa* L., germinadas a los 5 días con el cocultivo.

5.2.1.2. Efecto del bioinoculante sobre el crecimiento de *Allium cepa* L. en semillero

Para el establecimiento del semillero, se empleó suelo proveniente del sitio denominado “Tópaga” ($5^{\circ}46'04''N$ y $72^{\circ}49'54''W$) en donde se cultiva *A. cepa* en el Departamento de Boyacá. La caracterización inicial nutricional y físico química del suelo se presenta en la [Tabla 5.1](#). El suelo se desinfectó en dos ciclos de autoclavado de 15 min a 1,2 atm y 121 °C con intervalo de 24 h entre ciclos. Además, el suelo se irradió con luz UV a 254 nm por 12 h, empleando un reactor cúbico para fotólisis UV [45]. Para la siembra de las semillas, se utilizaron vasos plásticos de 266 mL que contenían 100 g de suelo. En cada uno se colocaron siete semillas de *A. cepa* L., cubiertas con suelo, las cuales recibieron diferentes tratamientos: 10 mL de consorcio ($8,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$), 10 mL del cocultivo ($8,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$), 10 mL de cada cepa ($8,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$) y 10 mL de agua destilada estéril. Cada tratamiento se realizó por triplicado [Fig. 5.2](#). Las unidades experimentales se regaron cada cuatro días durante un período de dos meses con los

productos descritos anteriormente, para un total de 16 aplicaciones equivalentes a 160 mL de producto, agua destilada o medio de cultivo en dos meses de evaluación. Las variables de respuesta fueron el porcentaje de emergencia de la semilla (las siete semillas sembradas en el suelo, fueron el 100 % para cada réplica, la longitud de la hoja en cm (se midió desde la base del tallo hasta el ápice), el peso seco en mg (cada planta se secó a 85° C durante 48 horas), [44], el recuento de BPS totales y el recuento de BPS por morfotipo, utilizando agar SMRS1-RP. Por último, se realizó una comparación de medias de todos los tratamientos: consorcio, cocultivo, cepas por separado y control, para establecer diferencias significativas entre tratamientos. Se utilizó el programa estadístico SAS® (SAS Institute 2017. versión STAT 9.0. Cary, NC: SAS Institute) para determinar las diferencias significativas.

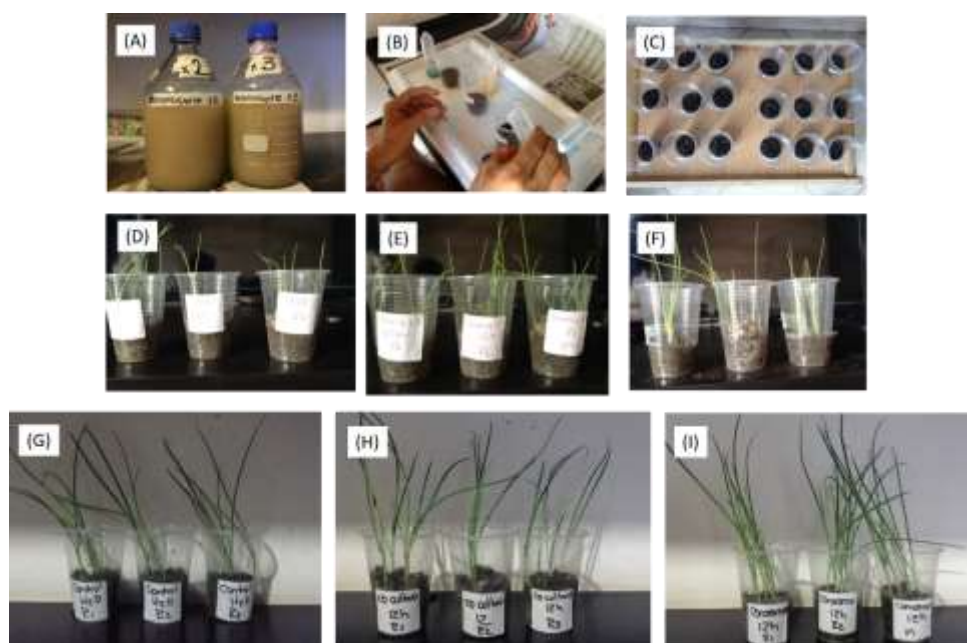


Figura 5.2. Efecto del bioinoculante sobre el crecimiento de *Allium cepa* L., en semillero a 19 ± 2 °C. (A) Inóculos producidos en medio MT11B para el consorcio y el cocultivo. (B) Preparación de suelo y siembra de semillas. (C) Suelo agrícola sembrado con las semillas de *A. cepa* L., al inicio del experimento. (D) Crecimiento de plántulas regadas con agua un mes después de la siembra. (E) Crecimiento con el consorcio al mes de evaluación. (F) Vista posterior del crecimiento con el consorcio al mes de evaluación, (G) Crecimiento de plántulas regadas con agua dos meses después de la siembra. (H) Crecimiento con el cocultivo a los dos meses de evaluación. (I) Crecimiento con el consorcio a los dos meses de evaluación.

5.2.2. Evaluación del efecto del bioinoculante y del fertilizante orgánico mineral Abundagro® sobre el crecimiento de *Allium cepa* L. en parcela

Para evaluar el efecto de las BPS en el cultivo de *A. cepa* L., en suelo, se empleó el bioinoculante compuesto por el consorcio (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.). En el [Capítulo 3](#) se presentan los resultados de la selección de los componentes del bioinoculante y las condiciones de producción.

El experimento se realizó en el municipio de Tópaga (Boyacá, Colombia) zona con temperatura diarias que oscilan entre 6 y 17 °C (5°46'04"N y 72°49'54"W) ([Fig. 5.3](#)). Los resultados de la caracterización inicial del suelo se presentan en la [Tabla 5.1](#), en donde el P extractable del suelo al momento de la siembra fue de 250 mg Kg⁻¹ [34]. Se evaluó el efecto del fertilizante comercial Abundagro® de origen orgánico mineral con y sin BPS. Para cada tratamiento se sembraron 40 plántulas de 2 meses de edad, obtenidas a partir de semilleros de *A. cepa* L., variedad Granex estándar (% de germinación > 80 %) ubicado al lado de la plantación y cuyo suelo es el mismo en el que se realizó el experimento. Las dosis de Abundagro® aplicadas fueron: 200 Kg ha⁻¹; 170 Kg ha⁻¹, 130 Kg ha⁻¹, 100 Kg ha⁻¹, 70 Kg ha⁻¹ y 50 Kg ha⁻¹. Las parcelas se manejaron con fertilización fraccionada en aplicaciones equitativas en tres momentos diferentes: en el momento del trasplante, un mes después del trasplante y dos meses después del trasplante. La composición garantizada del lote del bioinoculante usado para los ensayos a nivel de parcela se presenta en la [Tabla 5.2](#). El bioinoculante se aplicó a una concentración de 10x10⁷ UFC mL⁻¹ en volúmenes de 50 a 750 mL ha⁻¹ en los tiempos previamente descritos de acuerdo a la dosificación de los tratamientos que se presenta en la [Tabla 5.3](#). Se usó agua como control. Antes de iniciar el protocolo se realizó caracterización física, química y microbiológica del suelo [46]. Por último, se determinó la capacidad de campo del suelo para realizar los cálculos de la aplicación del fertilizante Abundagro® y del bioinoculante a base de BPS.

Tabla 5.1. Caracterización nutricional y físico química del suelo agrícola proveniente del sitio “Topaga”, empleado para la evaluación del bioinoculante en semillero y parcela.

Parámetro	Valor	Unidad	Método analítico
Textura franco-arcillosa			[47]
pH	4,70		Pasta Saturación/Potenciométrico
CE	1,06	(dS m ⁻¹)	Extracto Saturación/Conductímetro
Densidad aparente	1,03	g cc ⁻¹	Cálculo
Carbono orgánico	3,99	(%)	Colorimétrico [48]
Materia orgánica	6,87	(%)	Cálculo
Nitrógeno total	0,32	(%)	Micro-Kjeldhal [49]

Relación C/N	12		Cálculo
Potasio intercambiable	289	mg kg ⁻¹	Ac. NH ₄ /Absorción Atómica
Sodio intercambiable	60	mg kg ⁻¹	Ac. NH ₄ /Absorción Atómica
Hierro	42	mg kg ⁻¹	Mezcla ácida/Absorción Atómica/Mellich [50]
Boro	0,49	mg kg ⁻¹	Ca(OH)PO ₄ /Colorimétrico
Aluminio	17	mg kg ⁻¹	Cálculo
Fósforo	250	mg kg ⁻¹	Solución Bray II [51] /Colorimétrico
Amonio	39	mg kg ⁻¹	NaCl/Colorimétrico
Nitratos	58	mg kg ⁻¹	Ac. Na/Colorimétrico
Recuento de bacterias totales	5,4	Log ₁₀ UFC g ⁻¹	Recuento en placa
Recuento de BPS	2,9	Log ₁₀ UFC g ⁻¹	Recuento en placa

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados de los análisis propios y emitidos por AGRILAB S.A.S. (2018).

Tabla 5.2. Composición garantizada del lote del bioinoculante usado en los ensayos en parcela

Parámetro	Resultado	Unidades
Recuento de BPS totales	13	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹
Recuento de <i>Pseudomonas</i> sp.	12,8	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹
Recuento de <i>Serratia</i> sp.	12,5	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹
Recuento de <i>Kosakonia</i> sp.	11,7	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹
P total	354	mg L ⁻¹
P en solución	49	mg L ⁻¹
Nitratos	0,2	mg L ⁻¹
Nitritos	0,001	mg L ⁻¹
Sulfatos	19	mg L ⁻¹
pH	5,6	

Tabla 5.3. Tratamientos evaluados durante el experimento en parcela

Tratamiento	Dosis de Abundagro® y bioinoculante
1	200 Kg ha ⁻¹ Abundagro® + 50 mL BPS
2	170 Kg ha ⁻¹ Abundagro® + 150 mL BPS
3	130 Kg ha ⁻¹ Abundagro® + 350 mL BPS
4	100 Kg ha ⁻¹ Abundagro® + 500 mL BPS
5	70 Kg ha ⁻¹ Abundagro® + 650 mL BPS
6	50 Kg ha ⁻¹ Abundagro® + 750 mL BPS
7	200 Kg ha ⁻¹ Abundagro®
8	170 Kg ha ⁻¹ Abundagro®
9	130 Kg ha ⁻¹ Abundagro®
10	100 Kg ha ⁻¹ Abundagro®
11	70 Kg ha ⁻¹ Abundagro®
12	50 Kg ha ⁻¹ Abundagro®
13	1000 mL BPS
14	Control

Cinco meses después del trasplante se realizó la selección de 10 plantas al azar de cada tratamiento para determinar la altura del bulbo (AB en cm), el diámetro del bulbo (DB en cm),

el peso seco del bulbo (PSB en g) después del secado durante 8 días a 30 °C, tiempo en el cual las muestras alcanzaron un peso constante [52] y el P total en bulbo (PT en mg bulbo⁻¹) [53]. Así mismo, 5 muestras de suelo de cada tratamiento fueron colectadas a una profundidad entre 0-20 cm para obtener una muestra compuesta de los tratamientos evaluados. Se determinó el recuento de BPS y P soluble [54]. Para cada una de las variables evaluadas, se realizó un ANOVA y pruebas de comparaciones múltiples *post hoc* de Tukey. El análisis de los datos se realizó con los programas estadísticos R[®] (StatR, plataforma R Wizard versión 2.0) y Minitab[®] (Minitab 18.Ink. 2018. versión 18.0).

A partir de los resultados obtenidos en este experimento, se determinó la dosis de fertilización base con Abundagro[®] que se añadió al suelo agrícola en el que se evaluó el efecto del biofertilizante compuesto por el biochar producido en el [Capítulo 4](#) coinoculado con el bioinoculante a base de BPS producido en el [Capítulo 3](#).

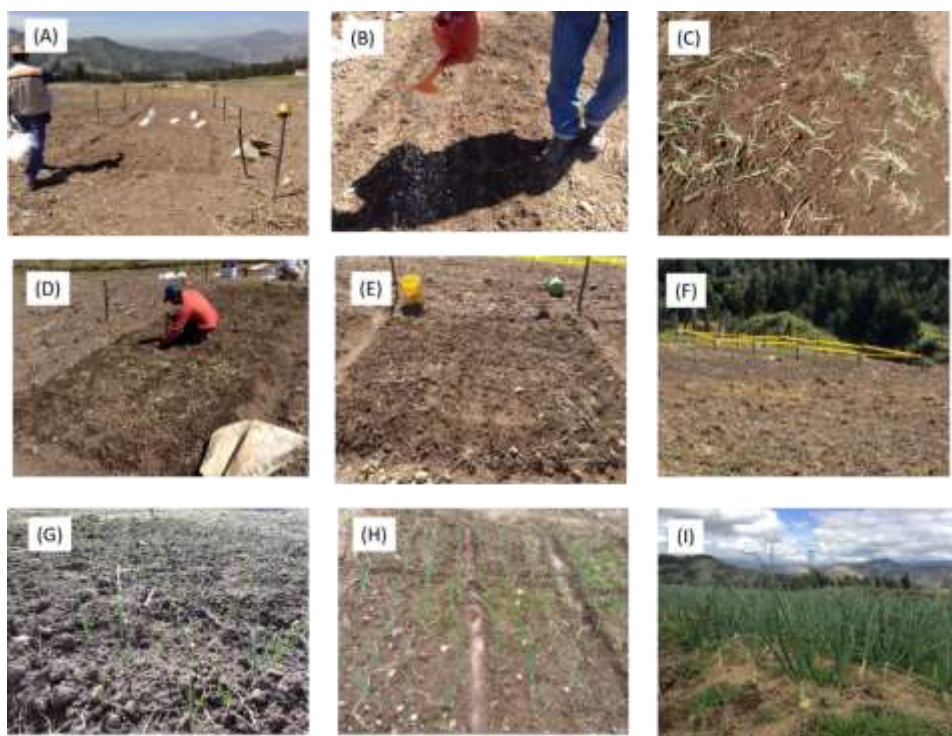


Figura 5.3. Efecto del bioinoculante sobre el crecimiento de *Allium cepa* L., a escala de parcela. (A) Demarcación del terreno para la ubicación de los tratamientos. (B) Riego manual. (C) Plántulas de cebolla. (D) Siembra de las cebollas. (E). Melga sembrada, (F) Demarcación del ensayo. (G) Plantas 5 días después del trasplante. (H) Plantas 5 días después del trasplante. (I) Plantas 5 meses después del trasplante.

5.2.3. Evaluación a nivel de materas del efecto del biofertilizante sobre el crecimiento de *A. cepa* L.

Una vez se determinó que las BPS colonizan y sobreviven en el BC después de tres meses (pruebas de estabilidad [Capítulo 4](#)), se preparó un nuevo lote de BC y se inoculó con bioinoculante fresco a base de BPS (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.) ([Fig. 5.4](#)), para evaluar su efecto sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en materas por un período de 4 meses. Los resultados del control de calidad del biofertilizante usado en este experimento se presentan en la [Tabla 5.4](#).

5.2.3.1. Producción del biofertilizante y control de calidad

Para realizar el experimento de evaluación del efecto del biofertilizante en *A. cepa* L., en materas, se produjo un nuevo lote al cual se le realizó caracterización físico química y microbiológica. El proceso de producción se muestra en la [Fig. 5.4](#).

Primero, se produjo el BC durante 1 h a 500 °C. Posteriormente se produjo el bioinoculante compuesto por las BPS *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp., en medio MT11B durante 6 h, a 30 °C y 200 rpm. Se realizó control de calidad a los dos componentes del biofertilizante (BC y BPS) y una vez verificada la reproducibilidad de los análisis con respecto a lotes anteriores se procedió a realizar la impregnación húmeda de las BPS sobre el BC. Los resultados de la caracterización del biofertilizante se presentan en [Tabla 5.4](#).



Figura 5.4. Producción del biofertilizante a base de BC y BPS. Lote usado en los ensayos en materas. (A) Presecado de APC para disminuir el porcentaje de humedad (70 °C por 24 horas). (B) APC después de pasar 12 h en una campana de anaerobiosis con Anaerogen® para desplazar el O₂ antes de producir el BC. (C) BC producido (1 h/500 °C). (D) Bioinoculante a base de BPS (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.) producido en medio MT11B. (E) Inmovilización de BPS sobre el BC para producir el biofertilizante. (F) Biofertilizante a base de BC y BPS.

Tabla 5.4. Control de calidad de las propiedades físicas del biofertilizante usado en los experimentos en materas

Parámetros	Biochar T2 coinoculado con BPS	Biochar T2 coinoculado con BPS Experimento final
Caracterización general		
Humedad (%)	99 ± 2	96 ± 6
Densidad (g cm ⁻³)	0,42 ± 0,1	0,487 ± 0,198
Volumen de saturación (mL)	ND	ND
Porosidad (%)	64,3 ± 1,1	63,5 ± 2,1
Tamaño de partícula (mm)	3,0 ± 1	3,0 ± 1
pH	6,4 ± 0,5	6,8 ± 0,9
Análisis próximo (wt.%, wet basis)		
COT (%)	54 ± 3	56,1 ± 2,1
Rendimiento en biochar	ND	ND
CF (%)	23 ± 2	27,4 ± 3,1
CV (%)	75 ± 3	70,3 ± 4,1
Cenizas (%)	2 ± 0,9	2,3 ± 0,81

ND: No determinado

Fuente: Elaboración propia

5.2.3.2. Alistamiento de suelo agrícola

Para la selección del suelo a usar en el experimento de evaluación del biofertilizante (BC/BPS) sobre el crecimiento de *A. cepa* L. en materas se tomaron 2 muestras, la primera de la finca ubicada en el sitio denominado “Punta Larga” (5°47'03,5”N y 72°58'52,6”W) de donde se aislaron dos de las bacterias que conforman el bioinoculante y cuyo esquema de fertilización es a base de biofertilizante orgánico mineral Abundagro® para el cultivo de cebolla. La segunda muestra tomada del sitio denominado “Tópaga” (5°46'04”N y 72°49'54”W) en donde se evaluó el efecto del bioinoculante compuesto por BPS en *A. cepa* L. y cuyo esquema de fertilización está basado en la aplicación de fertilizante inorgánico NPK (nitrógeno/fósforo/potasio) en dosis de 120/80/150 kg ha⁻¹ cosecha⁻¹ (N/P₂O₅/K₂O) [27]. A las dos muestras se les realizó análisis nutricional completo en un laboratorio externo y de allí se tomaron los valores de pH, P extractable y materia orgánica (MO), para decidir qué suelo usar (Tabla 5.1 y 5.5). Para el cultivo de cebolla de bulbo se busca que el suelo tenga un pH entre 6,0 y 7,0, contenido de P extractable >12 ppm y contenido de materia orgánica >2 %, [27,55].

El suelo empleado en este experimento proviene de la finca San Juan ubicada en la vereda Punta Larga del Municipio de Nobsa en el Departamento de Boyacá, Colombia y cuyas coordenadas geográficas son 5°47'03,5”N 72°58'52,6”W. Allí se recolectó el suelo agrícola en donde habitualmente se siembra cebolla y posteriormente se trasladó al Laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos de la Pontificia Universidad Javeriana. El suelo se secó a 40 °C durante 48 horas para facilitar su manejo y preparación. Una vez el suelo estuvo totalmente seco se disgregó con un mazo de caucho, se pasó por un molino y finalmente se tamizó con un tamiz N° 20 para generar partículas de 4-5 ± 1 mm. El suelo tamizado se empacó en bolsa plástica doble de polietileno de baja densidad (850 g de suelo en cada bolsa) y se desinfectó en húmedo en autoclave durante 15 min, 1,2 atm y 121 °C, cada 24 horas hasta completar tres ciclos de desinfección.

5.2.3.3. Alistamiento material vegetal

Se sembraron 600 semillas de *A. cepa* L., variedad Granex estándar en turba negra sin fertilizar, marca Impulsemillas® (composición: 70-150 mg L⁻¹ de NO₃-N, 25-110 mg L⁻¹ de PO₄-P, 70-170 mg L⁻¹ de K, 110-220 mg L⁻¹ de Ca, 30-60 mg L⁻¹ de Mg, 1-2,5 mg L⁻¹ de Fe, 0,1-1 mg L⁻¹ de Zn, <0,3 mg L⁻¹ de Cu, 0,3-1,5 mg L⁻¹ de Mn y <0,6 mg L⁻¹ de B). Los riegos se realizaron con agua

cada 2 días hasta los 20 días, garantizando capacidad de campo en la turba. El día 20 se retiraron las plántulas de las bandejas de germinación, se lavaron cuidadosamente con agua destilada y se clasificaron en tres grupos por peso. Posteriormente fueron trasplantadas al azar en las materas que contenían 850 g de suelo preparado de acuerdo a los tratamientos del diseño experimental (Fig. 5.5, Tabla 5.6).



Figura 5.5. Alistamiento del material vegetal para el experimento del efecto del biofertilizante en *A. cepa* L., en materas. A) y B) Plántulas de *A. cepa* L., de 20 días de edad, germinadas en turba, C) Clasificación de plántulas por tamaño, antes de ser trasplantadas a las materas, D) Suelo agrícola secado, tamizado y desinfectado, antes de ser preparado con el BC E) Plántulas trasplantadas a materas para la disposición final del ensayo.

5.2.3.4. Diseño experimental de bloques completamente al azar para evaluar del efecto del biofertilizante en materas

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de diferentes dosis de fertilizante orgánico mineral Abundagro[®] combinado con bioinoculante producido en medio MT11B sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en parcela (numeral 5.2.2) y cuyo estudio fue reportado por Blanco-Vargas *et al.*, (2020a), se determinó la dosis de fertilización base a usar para evaluar el efecto del biofertilizante (BC/BPS) en materas, que corresponde al 35% (70 kg ha^{-1}) de la dosis de Abundagro[®] recomendada por el productor (200 kg ha^{-1}) [10]. Adicionalmente, las dosis de biofertilizante (BC/BPS) se definieron en base a los resultados obtenidos en un estudio anterior con Moreno-Bayona *et al.*, (2019), en donde se evaluó el efecto de un bioproducto elaborado con biochar de aserrín de pino caribe y coinoculado con las tres BPS del consorcio (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.), en semillas de cebolla cabezona *Allium cepa* L.,

donde se favoreció el peso (mg) y la longitud (cm) de las plantas que se cultivaron en suelo con 2 y 5 % de bioproducto siendo estos los mejores tratamientos con respecto a los demás evaluados [32].

Para evaluar el efecto del biofertilizante (BC/BPS) se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar, en el cual en cada uno de los cuatro bloques se establecieron 6 tratamientos (Tabla 5.6). Se sembraron 40 plántulas de *A. cepa* L., por tratamiento (obtenidas de un semillero, como se explica en el numeral 5.2.3.3), para un total de 240 unidades experimentales. Cada unidad experimental contenía 850 g de suelo agrícola proveniente del sitio denominado “Punta Larga” (5°47'03,5”N y 72°58'52,6”W) como se menciona en el numeral 5.2.3.2. La caracterización nutricional completa del suelo inicial previo a realizar el montaje del experimento en materas se presenta en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Caracterización nutricional y físico química del suelo agrícola del sitio “Punta Larga” empleado para la evaluación del biofertilizante en materas.

Parámetro	Valor	Unidad	Método analítico
Textura franco-arcillosa			[47]
pH	7,73		Pasta Saturación/Potenciométrico
CE	1,15	(dS m ⁻¹)	Pasta Saturación/Conductímetro
CIC	37,0	meq 100 g ⁻¹	
Densidad aparente	0,909	g cc ⁻¹	Cálculo
Carbono orgánico	5,20	(%)	Colorimétrico [48]
Materia orgánica	8,96	(%)	Cálculo
Nitrógeno total	0,433	(%)	Micro-Kjeldhal [49]
Relación C/N	12		Cálculo
Potasio intercambiable	510	mg kg ⁻¹	Ac. NH ₄ /Absorción Atómica
Sodio intercambiable	260	mg kg ⁻¹	Ac. NH ₄ /Absorción Atómica
Calcio	6720	mg kg ⁻¹	Solución acetato de amonio/ NTC 5349 [56]
Magnesio	123	mg kg ⁻¹	Solución acetato de amonio/ NTC 5349 [56]
Hierro	8,41	mg kg ⁻¹	Mezcla ácida/Absorción Atómica/Mellich I [50]
Boro	1,96	mg kg ⁻¹	Ca(OH)PO ₄ /Colorimétrico
Fósforo total*	1590	mg kg ⁻¹	[57]
Fósforo extractable	168	mg kg ⁻¹	Solución Olsen [58] /Colorimétrico
Fósforo en solución	16,6	mg kg ⁻¹	Extracción con agua
Amonio	80,1	mg kg ⁻¹	NaCl/Colorimétrico
Nitratos	28,9	mg kg ⁻¹	Ac. Na/Colorimétrico
Manganeso	108	mg kg ⁻¹	Solución ácida Mellich I/ NTC 5526 [59]
Cobre	1,55	mg kg ⁻¹	Solución ácida Mellich I/ NTC 5526 [59]
Zinc	11,7	mg kg ⁻¹	Solución ácida Mellich I/ NTC 5526 [59]
Azufre	98,8	mg kg ⁻¹	Solución fosfato monobásico de calcio

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados de los análisis emitidos por AGRILAB S.A.S. (2019) y el *Laboratorio de suelos y aguas U. Tadeo (2019).

Los suelos de los diferentes tratamientos a evaluar sobre el crecimiento de *A. cepa* L. se prepararon según las dosis de fertilizante, BC o biofertilizante que se presentan en la **Tabla 5.6**. La fertilización base (Abundagro®) se aplicó en dosis única al momento del trasplante en los suelos de todos los tratamientos a excepción del tratamiento 6 ya que por ser el control con sólo agua no debía ser fertilizado. Luego se realizó el primer riego con agua antes de realizar el trasplante de la cebolla del semillero a la matera. Se tomó una muestra de suelo de cada tratamiento, del BC recién producido y del biofertilizante (BC/BPS) para realizar análisis nutricional completo en el laboratorio de referencia externo AGRILAB S.A.S. Los resultados se presentan en la **Tabla 5.7**. Para la siembra de las plántulas se emplearon materas plásticas redondas de 14 cm de diámetro, 12 cm de alto y volumen total de 1 Kg. Se adicionaron 850 g de suelo a evaluar en cada una de las materas (10 por tratamiento por bloque para un total de 240 unidades experimentales) y se procedió a realizar el trasplante. Se realizaron riegos a capacidad de campo (100 mL en cada matera), día de por medio con agua.

Tabla 5.6. Tratamientos evaluados durante el experimento en materas.

Tratamiento	Dosificación de Abundagro®, biofertilizante (BC/BPS) y biochar (BC)
T1	Suelo + Abundagro® 70 Kg ha ⁻¹ + biofertilizante (BC/BPS) al 5 % (m/m)
T2	Suelo + Abundagro® 70 Kg ha ⁻¹ + biofertilizante (BC/BPS) al 2 % (m/m)
T3	Suelo + Abundagro® 70 Kg ha ⁻¹ + biochar (BC) al 5 % (m/m)
T4	Suelo + Abundagro® 70 Kg ha ⁻¹ + biochar (BC) al 2 % (m/m)
T5	Suelo + Abundagro® 70 Kg ha ⁻¹
T6	100 % Suelo

Tabla 5.7. Análisis nutricional, microbiológico y pH inicial del suelo de los 6 tratamientos evaluados sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en materas.

Parámetro	Unidad	Tratamiento**							
		BC	BC/BPS	T1	T2	T3	T4	T5	T6
pH		6,2 ± 0,3	6,0 ± 0,6	7,44	7,59	7,41	7,65	7,65	7,73
CE	(dS m ⁻¹)	0,58	0,18	1,02	0,93	0,96	0,95	0,94	1,15
Densidad aparente	g cc ⁻¹	ND	ND	0,935	0,895	0,866	0,934	0,9	0,909
Carbono orgánico	(%)	ND	ND	4,79	5,79	6,22	5,05	5,54	5,2
Materia orgánica	(%)	ND	ND	8,26	9,98	10,7	8,71	9,55	8,96
Nitrógeno total	(%)	ND	ND	0,399	0,482	0,518	0,421	0,462	0,433
Relación C/N		ND	ND	12	12	12	12	12	12
Potasio intercambiable	mg kg ⁻¹	11,9*	6,8*	490	500	520	510	490	510
Sodio intercambiable	mg kg ⁻¹	46,0*	18,0*	280	270	280	260	280	260
Calcio	mg kg ⁻¹	54,0*	11,3*	6600	7050	6880	7080	6920	6720
Magnesio	mg kg ⁻¹	6,8*	2,75*	144	135	151	137	139	123
Hierro	mg kg ⁻¹	0,085*	0,065*	6,12	2,73	3,36	3,7	1,89	8,41
Boro	mg kg ⁻¹	0,4*	0,053*	1,73	1,73	1,76	1,73	1,68	1,96
Fósforo total***	mg kg ⁻¹	ND	ND	1773,6	1839	1923,8	2194,3	1786,9	1589,6
Fósforo extractable	mg kg ⁻¹	ND	ND	159	161	148	171	179	168
Fósforo en solución	mg kg ⁻¹	46,3*	21,9*	13	13,2	12,5	14,7	12,2	16,6

Amonio	mg kg ⁻¹	1,26*	0,480*	69,5	81,6	83	76,1	77,4	80,1
Nitratos	mg kg ⁻¹	0,75*	0,7*	31,7	35,8	33,2	32,8	35	28,9
Recuento BPS totales	Log ₁₀ UFC g ⁻¹	ND	ND	4,7	4,4	<100	<100	<100	<100
Recuento <i>Pseudomonas</i> sp.	Log ₁₀ UFC g ⁻¹	ND	ND	4,5	4,0	<100	<100	<100	<100
Recuento <i>Serratia</i> sp.	Log ₁₀ UFC g ⁻¹	ND	ND	4,1	3,7	<100	<100	<100	<100
Recuento <i>Kosakonia</i> sp.	Log ₁₀ UFC g ⁻¹	ND	ND	3,6	4,1	<100	<100	<100	<100

ND: No Determinado

*Para BC y biofertilizante (BC/BPS) concentración de estos compuestos se expresó en mg L⁻¹

**La descripción de los tratamientos se presenta en la [Tabla 5.6](#).

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados de los análisis emitidos por [AGRILAB S.A.S., \(2019\)](#) y el

***Laboratorio de suelos y aguas [U. Tadeo., \(2019\)](#).

Durante los 4 meses que duro el experimento la temperatura ambiental osciló entre $13,5 \pm 0,5$ y $14,5 \pm 0,5$ °C, el clima fue predominantemente seco los dos primeros meses del experimento y con temporada de lluvias los dos meses siguientes (aproximadamente 16 días/mes) e iluminación día/noche de 12/12 horas ([www.ideam.gov.co](#)). Cuatro meses después del trasplante se realizó la medición del peso fresco del bulbo (PFB) (mg), diámetro del bulbo (DB) (mm), altura del bulbo (AB) (mm), peso fresco de la raíz (PFR) (mg), longitud de la raíz (LR) (mm), peso fresco de las hojas (PFH) (mg), número de hojas (NH) y peso fresco total (PFT). Una vez realizadas estas mediciones, se secó todo el material vegetal a 40 °C durante 15 días, tiempo en el cual las muestras alcanzaron un peso constante [52]. Posteriormente se determinó el peso seco del bulbo (PSB) (mg), peso seco de la raíz (PSR), peso seco de las hojas (PSH) y peso seco total (PST) [60].

El análisis nutricional completo del material vegetal y los suelos se realizó en un laboratorio de referencia externo (AGRILAB S.A.S.), y para ello se seleccionaron al azar 2 bulbos de cebolla *A. cepa* L., de cada tratamiento de los 4 bloques con sus respectivos suelos, para un total de 8 bulbos y 8 muestras de suelo por tratamiento ([Tabla 5.10](#)).

La concentración final de los nutrientes en el suelo al finalizar la evaluación del biofertilizante en materas se expresó como la variación de las características del suelo ([Tabla 5.11](#)) la cual se calculó restando el valor obtenido al finalizar la evaluación del biofertilizante en materas ([Tabla 5.14](#)) del valor inicial obtenido de los análisis nutricionales completos que se realizaron a cada una de las muestras de los suelos evaluados en los tratamientos ([Tabla 5.5](#)), (valor inicial-valor final). La transformación de datos se realizó para dar cumplimiento a los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Para cada una de las variables evaluadas, se aplicó la prueba estadística de ANOVA y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey. Adicionalmente, para determinar si los cambios en los atributos del suelo influyeron sobre las variables asociadas al crecimiento de la cebolla se realizó un análisis de correlación múltiple. El análisis de los datos se realizó con los programas estadísticos R[®] (StatR, plataforma R Wizard versión 2.0) y Minitab[®] (Minitab 18.Ink. 2018. versión 18.0).

5.3. Resultados

5.3.1. Efecto del bioinoculante sobre la germinación de *A. cepa* L.

5.3.1.1. Efecto del bioinoculante sobre la germinación de semillas de *A. cepa* L., en cámara húmeda en el laboratorio

En el porcentaje de germinación en cámara húmeda se observaron diferencias significativas entre las cepas por separado, el cocultivo, el consorcio, el control con agua destilada y el control con medio MT11B estéril ($p < 0,0001$). Se obtuvieron porcentajes del 60 ± 7 , 53 ± 12 , 63 ± 8 , 90 ± 8 , 98 ± 4 , 79 ± 3 y 83 ± 4 %, para *Kosakonia* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., cocultivo, consorcio, agua destilada y medio MT11B diluido 1/1000, respectivamente. Estos resultados indicaron que al emplear las bacterias en consorcio y cocultivo a concentración de $8,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ se favorece la germinación de las semillas de *A. cepa* L. Adicionalmente, los resultados demostraron que ni las bacterias en consorcio y cocultivo ni los componentes del medio MT11B ejercieron un efecto adverso sobre la germinación de las semillas (Fig. 5.6).

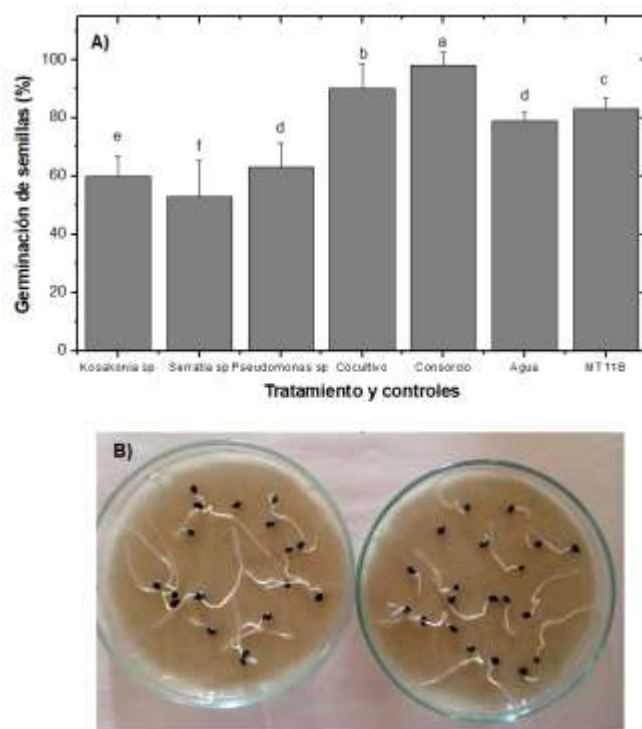


Figura 5.6. Germinación de semillas en cámara húmeda. A) Porcentaje de germinación de semillas de *A. cepa* L., en cámara húmeda, B) Semillas con 5 días de germinación en cámara húmeda. Los resultados son el promedio de tres réplicas cada una con 20 repeticiones y su respectiva desviación estándar. Las letras sobre las barras indica los grupos heterogéneos de los diferentes tratamientos ($p < 0,05$) según la prueba de Tukey.

5.3.1.2. Efecto del bioinoculante sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en semillero

Se utilizó un suelo fuertemente ácido, franco arcilloso con bajo contenido de materia orgánica, relación C/N de 12, con concentraciones altas de fósforo extractable (PE) (250 mg L^{-1}), y concentraciones medias de hierro (42 mg kg^{-1}) y aluminio (17 mg kg^{-1}) (Tabla 5.1), [61]., lo que sugiere que el fósforo podría estar en formas de fosfatos de hierro y de aluminio a $\text{pH } 4,72 \pm 0,2$. En relación con los microorganismos cultivables en la muestra de suelo, se encontraron $5,4 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ de bacterias totales y se relacionó con el contenido de materia orgánica, ya que los suelos con bajo contenido de materia orgánica tienden a contener concentraciones bajas de microorganismos. Los recuentos de BPS totales fueron bajos ($2,9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$) y no se detectó actividad fosfatasa en suelo. Lo anterior concuerda con la afirmación de Chen *et al.*, (2020) quienes proponen que la materia orgánica del suelo es un indicador importante de la fertilidad y una fuente importante de nutrientes microbianos [62].

Al emplear suelo agrícola para las pruebas en semillero y aplicar cultivos del consorcio, el cocultivo, cada cepa por separado y el control con agua destilada se obtuvieron diferencias significativas en la prueba de ANOVA en el peso seco total del consorcio y el cocultivo, respecto a los demás tratamientos y el control, demostrando que al aplicar el consorcio y el cocultivo en concentraciones de $8,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ dos veces por semana en un período de 2 meses se incrementó el peso seco total y se obtuvieron valores de $70 \pm 4 \text{ mg}$ ($p < 0,0001$) y $69 \pm 13 \text{ mg}$ ($p = 0,0001$), mientras que se obtuvo $50 \pm 4 \text{ mg}$ ($p = 0,0023$), $47 \pm 7 \text{ mg}$ ($p = 0,0030$), $35 \pm 2 \text{ mg}$ ($p < 0,0001$) y $38 \pm 5 \text{ mg}$ ($p = 0,0078$), para *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Kosakonia* sp., y el control respectivamente (Fig. 5.7A). Para las plantas inoculadas con el consorcio la altura fue de $20 \pm 3 \text{ cm}$, seguido por las inoculadas con el cocultivo, con *Pseudomonas* sp., con *Serratia* sp., y con *Kosakonia* sp., con $17,3 \pm 0,8 \text{ cm}$, $13,8 \pm 0,2 \text{ cm}$, $11,7 \pm 0,5$ y $10 \pm 2 \text{ cm}$, respectivamente (Fig. 5.7A). En las plantas del control (agua destilada) el resultado fue de $15,4 \pm 1,9 \text{ cm}$.

Al realizar los análisis microbiológicos en las muestras de suelo, se observó que para las bacterias heterótrofas totales los recuentos fueron similares y oscilaron entre $5,0 \pm 1,0$ y $5,9 \pm 0,1 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ ($p > 0,0001$). Para las BPS totales los recuentos fueron significativamente más altos en los tratamientos (consorcio, cocultivo, *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.) que en el control con agua ($p < 0,0001$) (Fig. 5.7B). Por otro lado, los resultados mostraron que las bacterias sobreviven en el suelo durante el período de evaluación ya que los componentes del

medio favorecen su viabilidad y aún después de la desinfestación del suelo se mantienen las poblaciones bacterianas.

En relación con los recuentos de cada morfotipo en el consorcio las tres bacterias mantuvieron recuentos de $5,5 \pm 0,4$, $5,5 \pm 0,2$ y $5,2 \pm 0,3$ Log_{10} UFC mL^{-1} para *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., y *Kosakonia* sp. En el caso del cocultivo las dos bacterias presentaron recuentos de $4,4 \pm 0,7$ y $4,6 \pm 0,4$ Log_{10} UFC mL^{-1} para *Serratia* sp., y *Pseudomonas* sp., respectivamente. Tanto para el consorcio como para el cocultivo, los recuentos por morfotipos fueron similares, demostrando que las BPS permanecen viables en el suelo.

El pH tuvo un incremento en todos los tratamientos (pH inicial: $4,72 \pm 0,2$) obteniendo valores de 6,2, 5,6, 5,2, 5,6, 6,1 y $5,4 \pm 0,2$ para el consorcio, cocultivo, *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Kosakonia* sp., y el control con agua, sin que fueran estadísticamente diferentes ($p > 0,01$), (Fig. 5.7C).

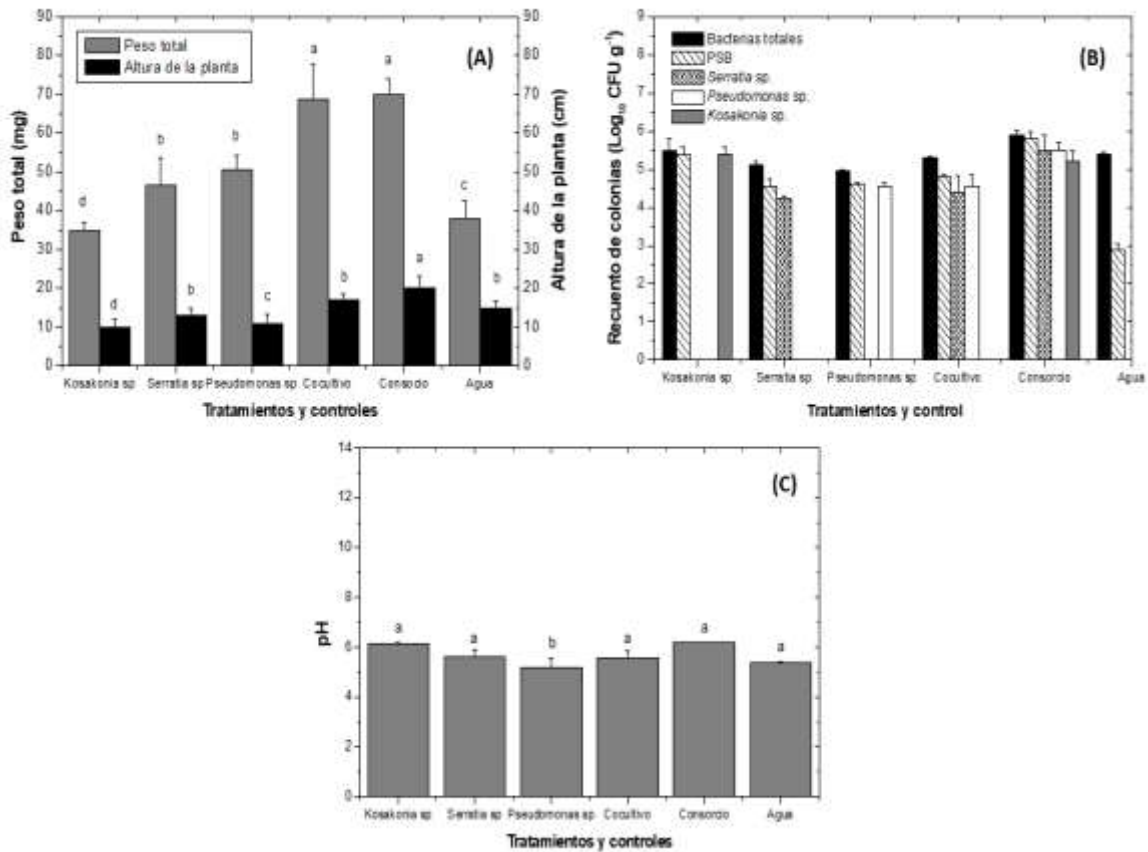


Figura 5.7. Pruebas en semillero usando suelo agrícola del sitio “Tópaga”. A) Peso seco total de la cebolla y longitud de las hojas. (B) Recuento de bacterias totales C) pH del suelo. Las letras a, b, c y d sobre las barras de la figura (A) indican que hay grupos heterogéneos y en consecuencia diferencias significativas ($p < 0,01$). La letra a sobre las barras de la figura (C) indica que no hay diferencias significativas ($p > 0,01$) según la prueba de Tukey.

Finalmente, al realizar la correlación entre variables para el experimento en semillero se observaron correlaciones positivas significativas para el peso seco ($\rho = 0,91$, $p < 0,0033$), la altura de plántula ($\rho = 0,92$, $p < 0,0067$) y el recuento de BPS ($\rho = 0,91$, $p < 0,0055$), en los tratamientos con el consorcio y el cocultivo; demostrando, que las BPS *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., y *Kosakonia* sp., están directamente relacionadas con el crecimiento de plántulas.

5.3.2. Efecto del bioinoculante y del fertilizante orgánico mineral Abundagro® sobre el crecimiento de *A. cepa* L. en parcela

Se evaluó el efecto del bioinoculante compuesto por las BPS (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.) sobre el crecimiento de *A. cepa* L. En el [Capítulo 3](#), se presenta el proceso de producción del bioinoculante. La composición garantizada del lote del bioinoculante usado para los ensayos a nivel de parcela se presenta en la [Tabla 5.2](#).

La caracterización físico química del suelo utilizado (**Tabla 5.1**), mostró que se trataba de un suelo fuertemente ácido (pH 4,7), con alto contenido de P extractable (250 mg Kg^{-1}), contenidos medios de aluminio (17 mg Kg^{-1}) y de hierro (42 mg Kg^{-1}) y bajos de materia orgánica (6,87 %). Las poblaciones de BPS alcanzaron valores de $2,9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$.

Los resultados del efecto del bioinoculante sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en parcela se presenta en la **Tabla 5.8**. Después de 5 meses de cultivo, se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados para la altura del bulbo (AB) ($p < 0,001$), el diámetro del bulbo (DB), ($p < 0,001$) y el peso seco del bulbo (BPS) ($p < 0,001$). Las plantas que recibieron la aplicación de 100 Kg ha^{-1} de Abundagro® y 500 mL de bioinoculante (T4) presentaron los mayores valores para todas las variables evaluadas ($170,1 \pm 22,2 \text{ mm}$ para AB, $49,4 \pm 6,5 \text{ mm}$ para DB, $9,0 \pm 1,8 \text{ g}$ para BPS). Por el contrario, la aplicación de altas dosis del fertilizante tuvo efectos negativos sobre el crecimiento de la cebolla como se muestra en los resultados de los tratamientos 7, 8 y 9 (T7: $128,4 \pm 18,8 \text{ mm}$ para AB, $37,5 \pm 8,4 \text{ mm}$ para DB, $4,5 \pm 1,8 \text{ g}$ para BPS; T8: $122,9 \pm 19,9 \text{ mm}$ para AB, $31,8 \pm 6,1 \text{ mm}$ para DB, $3,3 \pm 1,2 \text{ g}$ para PSB; T9: $120,2 \pm 20,4 \text{ mm}$ para AB, $32,3 \pm 6,8 \text{ mm}$ para DB, $3,0 \pm 1,1 \text{ g}$ para BPS). Los resultados de estos tratamientos fueron incluso menores a los obtenidos en tratamientos en los que sólo se aplicó el bioinoculante.

En relación con el contenido de P total en la cebolla, las plantas de los tratamientos en los que se aplicaron las menores dosis del fertilizante, con o sin bioinoculante, presentaron los menores valores (T6 = $7,74 \text{ mg bulbo}^{-1}$ y T12 = $3,37 \text{ mg bulbo}^{-1}$), mientras que aquellas que presentaron el mayor valor corresponden a las fertilizadas con dosis altas de Abundagro® 200 Kg ha^{-1} con bioinoculante (T1 = $16,86 \text{ mg bulbo}^{-1}$), seguidas de las plantas a las que se les aplicó 100 Kg ha^{-1} de fertilizante sin y con bioinoculante (T10 = $16,43 \text{ mg bulbo}^{-1}$; T4 = $15,21 \text{ mg bulbo}^{-1}$), respectivamente. Tanto el contenido de P en bulbos como el diámetro del bulbo de cebollas biofertilizadas presentaron en general valores mayores que aquellas cebollas producidas con la aplicación sólo del fertilizante. Es de destacar el DB ($45,3 \pm 8,4 \text{ mm}$) de *A. cepa* L. en T13, este tratamiento recibió solo bioinoculante y el contenido de PT en bulbo fue de $8,75 \text{ mg bulbo}^{-1}$.

Al finalizar el experimento, la concentración de P en solución del suelo fue 1,36 mg Kg⁻¹ para T4, mientras que el suelo con la misma dosis sólo de fertilizante, alcanzó valores de 0,21 mg Kg⁻¹.

Tabla 5.8. Efecto de la fertilización con Abundagro® y bacterias fosfato solubilizadoras sobre el crecimiento de *A. cepa* L en parcela.

Tratamiento	Altura del bulbo (mm)	Diámetro del bulbo (mm)	Peso seco del bulbo (g)	Fósforo total (PT) en bulbo* (mg bulbo ⁻¹)
T1	142,4 ± 27,1 ^c	47,8 ± 6,7 ^b	6,2 ± 2,2 ^b	16,86
T2	140,3 ± 28,1 ^d	46,9 ± 6,5 ^b	4,4 ± 2,5 ^e	10,21
T3	139,5 ± 25,0 ^d	48,2 ± 8,8 ^b	5,6 ± 1,2 ^c	9,46
T4	170,1 ± 22,2 ^a	49,4 ± 6,5 ^a	9,0 ± 1,8 ^a	15,21
T5	163,5 ± 34,3 ^b	42,5 ± 10,6 ^c	6,4 ± 2,9 ^b	10,94
T6	132,3 ± 20,5 ^e	32,7 ± 8,1 ^d	4,0 ± 2,3 ^e	7,74
T7	128,4 ± 18,8 ^e	37,5 ± 8,4 ^c	4,5 ± 1,8 ^d	12,47
T8	122,9 ± 19,9 ^e	31,8 ± 6,1 ^d	3,3 ± 1,2 ^e	9,44
T9	120,2 ± 20,4 ^e	32,3 ± 6,8 ^d	3,0 ± 1,1 ^e	ND
T10	143,0 ± 28,1 ^c	38,5 ± 7,8 ^c	6,6 ± 3,1 ^b	16,43
T11	142,7 ± 22,7 ^c	37,9 ± 9,6 ^c	5,5 ± 2,6 ^d	11,11
T12	106,0 ± 13,4 ^e	24,7 ± 4,2 ^e	2,2 ± 0,9 ^f	3,37
T13	141,3 ± 22,6 ^d	45,3 ± 8,4 ^b	5,5 ± 1,7 ^c	8,75
T14	100,4 ± 17,4 ^e	19,5 ± 4,5 ^e	1,4 ± 0,6 ^f	2,13

ND: No Determinado

* Extracción de P en bulbo = concentración de P en el bulbo*peso seco del bulbo (mg)*100⁻¹

Las letras en los superíndices representan los subconjuntos heterogéneos de la prueba estadística de Tukey con diferencias altamente significativas (p <0,05).

5.3.3. Efecto del biofertilizante sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en materas

En el análisis nutricional inicial del suelo de los 6 tratamientos evaluados sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en materas se obtuvieron pH y concentraciones similares en varios de los micronutrientes cuantificados debido a que el suelo estaba recién fertilizado de acuerdo a los tratamientos que se muestran en la **Tabla 5.6**. En cuanto a los macronutrientes, se observó para P total concentraciones más altas en el suelo de los tratamientos que contenían BC con respecto a los suelos de los tratamientos que no contenían ni BC ni biofertilizante, asociado al contenido de P en solución presente en el BC recién producido (46,3 mg Kg⁻¹ de P soluble) y en los suelos de los tratamientos que adicionalmente contenían BPS posiblemente debido al P de la RP del contiene en su formulación el bioinoculante (21,9 mg L⁻¹ de P soluble). Con respecto al análisis nutricional del BC y el biofertilizante se obtuvieron concentraciones de nutrientes más altas en el biofertilizante, asociado principalmente a los contenidos del medio (**Tabla 5.7**).

En relación al recuento de BPS totales iniciales, antes de realizar la siembra, se observaron similares en los dos tratamientos que contenían bacterias (T1: 4,7 y T2: 4,4 Log₁₀ UFC g⁻¹). Las bacterias que componen el consorcio se mantuvieron en proporciones iguales cuando fueron formuladas en el BC para producir el biofertilizante con respecto a los demás, tratamientos que no contenían BPS en donde los recuentos iniciales fueron <100 Log₁₀ UFC g⁻¹ (**Tabla 5.7**).

5.3.3.1. Efecto del biofertilizante sobre el crecimiento de *A. cepa* L.

Se observaron diferencias significativas en el peso fresco total de las plantas ($p < 0,05$), siendo T1 el mejor tratamiento para esta variable con $25,57 \pm 1,14$ g, seguido por T2, T4 y T3 con $22,80 \pm 1,00$, $20,50 \pm 1,01$ y $19,57 \pm 0,82$ g respectivamente. Lo anterior indica que tanto el biofertilizante como el BC tuvieron un efecto positivo en el crecimiento de las plantas con respecto a los tratamientos en los que se usó solo Abundagro® y solo agua. Los mayores pesos frescos y secos radicales se obtuvieron para T2 con $6,68 \pm 0,31/0,54 \pm 0,03$, seguido por T1 con $6,30 \pm 0,23/0,50 \pm 0,02$ g, observándose diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). Aunque en el análisis estadístico para peso fresco de bulbo y número de hojas no se obtuvieron diferencias significativas, se destacan los pesos más altos en los bulbos de T1 y T2 con $12,11 \pm 0,57$ y $10,23 \pm 0,60$ g, en los demás tratamientos el resultado fue $< 9,67$ g. En T2 también se obtuvo la mayor longitud en la raíz ($193,50 \pm 4,59$ mm). Para las demás, variables no se obtuvieron diferencias entre tratamientos (**Tabla 5.9**).

Tabla 5.9. Efecto del biofertilizante en el crecimiento de *A. cepa* L., en materas. Variables físicas.

Tratamiento	Descripción del tratamiento	Peso fresco (g)			
		Bulbo ^{ns}	Raíz	Hojas ^{ns}	Total ^{ns}
1	Abundagro® + 5% Biochar + BPS	12,11 ± 0,57	6,30 ± 0,23 ab	8,64 ± 0,34	25,57 ± 1,14 a
2	Abundagro® + 2% Biochar + BPS	10,23 ± 0,60	6,68 ± 0,31 a	8,73 ± 0,43	22,80 ± 1,00 ab
3	Abundagro® + 5% Biochar solo	8,37 ± 0,51	4,46 ± 0,22 bc	7,32 ± 0,26	19,57 ± 0,82 ab
4	Abundagro® + 2% Biochar solo	8,48 ± 0,58	5,83 ± 0,35 abc	8,42 ± 0,44	20,50 ± 1,01 ab
5	Abundagro®	8,42 ± 0,74	4,19 ± 0,27 bc	7,02 ± 0,39	18,54 ± 1,20 b
6	Agua	9,67 ± 0,82	3,90 ± 0,33 c	7,17 ± 0,42	19,51 ± 1,42 ab
	CV (%)	19,51	17,53	16,48	13,11

Tratamiento	Descripción del tratamiento	Peso seco (g)			
		Bulbo ^{ns}	Raíz	Hojas ^{ns}	Total ^{ns}
1	Abundagro® + 5% Biochar + BPS	0,88 ± 0,04	0,50 ± 0,02 ab	0,74 ± 0,03	2,00 ± 0,08
2	Abundagro® + 2% Biochar + BPS	0,83 ± 0,05	0,54 ± 0,03 a	0,74 ± 0,03	1,98 ± 0,08
3	Abundagro® + 5% Biochar sólo	0,65 ± 0,04	0,38 ± 0,02 bc	0,67 ± 0,03	1,67 ± 0,07
4	Abundagro® + 2% Biochar sólo	0,61 ± 0,04	0,41 ± 0,02 abc	0,60 ± 0,03	1,54 ± 0,09
5	Abundagro®	0,64 ± 0,05	0,30 ± 0,02 c	0,55 ± 0,03	1,46 ± 0,10
6	Agua	0,79 ± 0,06	0,33 ± 0,03 c	0,61 ± 0,04	1,66 ± 0,12
	CV (%)	21,05	16,16	16,04	16,29

Tratamiento	Descripción del tratamiento	Diámetro	Altura bulbo	Longitud raíz	Número de
		bulbo (mm) ^{ns}	(mm) ^{ns}	(mm)	hojas ^{ns}
1	Abundagro® + 5% Biochar + BPS	22,36 ± 0,51	56,27 ± 1,26	153,10 ± 3,86 bc	6,26 ± 0,11
2	Abundagro® + 2% Biochar + BPS	20,87 ± 0,57	55,01 ± 1,30	193,50 ± 4,59 a	6,27 ± 0,11
3	Abundagro® + 5% Biochar sólo	18,91 ± 0,52	55,07 ± 1,61	137,29 ± 2,85 c	5,87 ± 0,11
4	Abundagro® + 2% Biochar sólo	19,36 ± 0,67	51,08 ± 1,19	182,08 ± 5,61 ab	6,00 ± 0,11
5	Abundagro®	18,15 ± 0,70	58,01 ± 1,51	189,38 ± 6,40 a	5,57 ± 0,14
6	Agua	21,06 ± 0,88	62,17 ± 1,35	168,56 ± 5,94 abc	5,53 ± 0,16
	CV (%)	9,72	10,39	8,63	6,07

Las letras diferentes al lado de los números muestran los grupos heterogéneos según la prueba de Tukey e indican que hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). ns = no hay diferencias significativas según prueba F ($p > 0,05$). CV = coeficiente de variación

5.3.3.2. Efecto del biofertilizante sobre la composición nutricional del bulbo

Los valores relacionados con la concentración de nutrientes minerales en los bulbos de cebolla se presentan en la **Tabla 5.10.** en donde no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) para el contenido de macronutrientes en bulbo (P, N, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, y S), pero se destaca el T2 con las mayores concentraciones, excepto de Mg²⁺, con respecto a los demás tratamientos evaluados. Para el contenido de micronutrientes las diferencias fueron significativas para Fe³⁺ y Cu⁺, en el primero la mayor concentración se obtuvo en T2 (0,1217 ±

0,0243 mg bulbo⁻¹), seguido por T1 (0,0710 ± 0,0204 mg bulbo⁻¹) y T6 (0,0690 ± 0,0137 mg bulbo⁻¹), mientras que el mayor contenido Cu⁺ se presentó en T1 (0,0016 ± 0,0006 mg bulbo⁻¹), seguido por T2, T3 y T4. Al igual que lo mencionado anteriormente, aunque sin diferencias estadísticamente significativas, en general las plantas de T2 presentan los mayores contenidos de los micronutrientes evaluados.

Tabla 5.10. Contenido de macronutrientes y micronutrientes en el bulbo de *A. cepa* L.

Tratamiento	Descripción del tratamiento	Contenido de macronutrientes (mg bulbo ⁻¹) ^{ns}					
		P	N	K	Ca	Mg	S
1	Abundagro® + 5% Biochar + BPS	1,25 ± 0,13	10,87 ± 0,88	15,82 ± 1,88	10,04 ± 0,50	0,72 ± 0,11	1,85 ± 0,17
2	Abundagro® + 2% Biochar + BPS	1,38 ± 0,14	12,21 ± 1,09	17,09 ± 1,23	12,46 ± 1,49	0,76 ± 0,07	2,09 ± 0,13
3	Abundagro® + 5% Biochar sólo	0,81 ± 0,10	7,17 ± 0,60	10,16 ± 0,99	7,56 ± 0,81	0,49 ± 0,06	1,27 ± 0,12
4	Abundagro® + 2% Biochar sólo	1,02 ± 0,29	8,79 ± 1,87	14,70 ± 3,45	10,33 ± 2,10	0,58 ± 0,15	1,51 ± 0,41
5	Abundagro®	0,76 ± 0,14	7,58 ± 0,73	10,44 ± 0,93	7,81 ± 0,74	0,49 ± 0,03	1,26 ± 0,18
6	Agua	1,17 ± 0,22	11,08 ± 2,17	16,59 ± 3,35	12,20 ± 2,90	0,90 ± 0,31	1,88 ± 0,31
	CV (%)	33,92	30,48	32,28	35,45	48,72	31,02

Tratamiento	Descripción del tratamiento	Contenido de micronutrientes (mg bulbo ⁻¹)					
		Na ^{ns}	Fe	Mn ^{ns}	Cu	Zn ^{ns}	B ^{ns}
1	Abundagro® + 5% Biochar + BPS	1,2678 ± 0,0761	0,0710 ± 0,0204 ab	0,0258 ± 0,0079	0,0016 ± 0,0006 a	0,0182 ± 0,0026	0,0291 ± 0,0016
2	Abundagro® + 2% Biochar + BPS	1,6455 ± 0,2156	0,1217 ± 0,0243 a	0,0262 ± 0,0038	0,0006 ± 0,0004 ab	0,0202 ± 0,0024	0,0333 ± 0,0032
3	Abundagro® + 5% Biochar sólo	0,9166 ± 0,0918	0,0490 ± 0,0110 b	0,0176 ± 0,0030	0,0008 ± 0,0004 ab	0,0148 ± 0,0033	0,0199 ± 0,0013
4	Abundagro® + 2% Biochar sólo	1,4225 ± 0,4615	0,0435 ± 0,0073 b	0,0157 ± 0,0032	0,0005 ± 0,0004 ab	0,0144 ± 0,0033	0,0229 ± 0,0048
5	Abundagro®	0,9165 ± 0,0758	0,0416 ± 0,0028 b	0,0139 ± 0,0019	0,0003 ± 0,0002 b	0,0119 ± 0,0013	0,0194 ± 0,0023
6	Agua	1,1793 ± 0,1682	0,0690 ± 0,0137 ab	0,0139 ± 0,0023	0,0004 ± 0,0001 b	0,0157 ± 0,0018	0,0343 ± 0,0036
	CV (%)	39,04	46,25	35,72	71,04	32,87	24,98

Las letras diferentes al lado de los números muestran los grupos heterogéneos según la prueba de Tukey e indican que hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). ns = no hay diferencias significativas ($p > 0,05$). CV = coeficiente de variación

5.3.3.3. Efecto del biofertilizante sobre el contenido de nutrientes en el suelo

Al analizar la variación en la fertilidad del suelo antes y después de la siembra, se observaron diferencias significativas para la mayoría de las variables (**Tabla 5.11**). El signo negativo en los valores de algunas variables indica un incremento en el contenido del nutriente o variable en el suelo al finalizar el experimento, con respecto al contenido inicial antes del trasplante. La tabla con los valores al finalizar el ensayo se presenta en el **Anexo 5.8.2 (Tabla 5.14)**.

El pH de T1 y T3 aumentó $0,25 \pm 0,01$ y $0,29 \pm 0,02$ unidades con respecto al pH inicial ($7,69 \pm 0,04$ y $7,70 \pm 0,05$). Estos dos tratamientos contenían BC al 5 % (m/m) pero en T1 estaba como biofertilizante, que al contener BPS productoras de ácidos orgánicos causó menos alcalinización del suelo. La mayor variación de pH se presentó en T2 en donde el pH inicial fue 7,44 y finalizó en $7,23 \pm 1,25$.

La diferencia en el contenido de P total (PT) en el suelo fue menor en T1, T2 y T6 indicando que hubo mayor movilización de este elemento en estos tres tratamientos. Adicionalmente se destaca la concentración final de P total en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 (1464 ± 127 , 1523 ± 126 , 1469 ± 179 y 1445 ± 167 mg Kg⁻¹), siendo las más altas de los 6 tratamientos y que están asociadas a la presencia de BC, el cual recién producido presentó contenido de P soluble de 46,3 mg L⁻¹ reportado en el análisis nutricional completo y/o BPS las cuales fueron cultivadas en medio MT11B cuya formulación tiene como fuente de P roca fosfórica (RP). El contenido de PS en el biofertilizante fue de 21,9 mg L⁻¹ (**Tabla 5.7**).

En cuanto al P soluble en suelo, la concentración en el suelo de T1 fue una de las menores ($6,43 \pm 0,45$ mg Kg⁻¹) con respecto a los demás tratamientos evaluados y se relaciona con el contenido de P en los bulbos del mismo tratamiento (T1) en donde se presentó una de los mayores contenidos de P en los bulbos de las cebollas con $1,25 \pm 0,13$ mg bulbo⁻¹ (**Tabla 5.10 y 5.13**). El peso fresco total ($25,57 \pm 1,14$ g) y el peso seco total ($2,00 \pm 0,08$ g) de las cebollas fue el mayor de todos los tratamientos en T1 con diferencias significativas en el PFT ($p < 0,05$).

El P extractable en el suelo está asociado a elementos como el Ca²⁺ y Mg²⁺ cuando el pH del suelo es alcalino como se presentó en este estudio. La menor variación en la concentración de P extractable en suelo se presentó en T1, T2 y T3 (variaciones: $57,80 \pm 4,95$, $67,60 \pm 3,26$ y $60,03$

$\pm 2,38 \text{ mg Kg}^{-1}$ respectivamente) con concentraciones finales de $101,2 \pm 12,1$, $93,4 \pm 8,0$ y $88,0 \pm 5,8 \text{ mg Kg}^{-1}$ para T1, T2 y T3 respectivamente. En los tratamientos T4, T5 y T6 se presentó la mayor variación en la concentración final de P extraíble con respecto a los tratamientos T1, T2 y T3. En T1 y T2 se atribuye a la presencia de BPS que a través de la producción de ácidos orgánicos liberan P soluble a partir de la fracción de P extraíble **(Tabla 5.5 y 5.11)**.

El pH final del suelo de los diferentes tratamientos fue ligeramente alcalino con valores que oscilaron en un rango entre 7,23 y 7,76 **(Tabla 5.14)**. En este estudio, el P en el suelo podría estar asociado principalmente al contenido de Ca^{2+} cuyos valores son muy altos en todos los suelos. Sin embargo, como se presenta en el T1, la variación en la concentración de P extractable fue la menor de todos los tratamientos (T1: $57,80 \pm 4,95 \text{ mg Kg}^{-1}$) presentando una concentración de final de $101,2 \pm 12,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ y se relaciona con la concentración de calcio en este mismo tratamiento (T1: $5286,7 \pm 228,6 \text{ mg Kg}^{-1}$) la cual fue una de las menores de todos los tratamientos evaluados **(Tabla 5.11 y 5.13)**. Lo anterior se vio reflejado en el peso fresco y peso seco de la raíz, los cuales fueron mayores en T1 ($6,30 \pm 0,23 \text{ g}$ y $0,50 \pm 0,02 \text{ g}$) y T2 ($6,68 \pm 0,31 \text{ g}$ y $0,54 \pm 0,03 \text{ g}$) con respecto a la mayoría de los tratamientos **(Tabla 5.10)**. El P soluble que es la fracción que se encuentra en la solución del suelo en forma de ion y que puede ser asimilado inmediatamente por la planta, presentó la menor variación en la concentración de P soluble en el suelo de T5 ($4,65 \pm 0,31 \text{ mg L}^{-1}$), seguido por T3 ($5,19 \pm 0,45 \text{ mg L}^{-1}$), T1 ($6,57 \pm 0,18 \text{ mg L}^{-1}$) y T2 ($6,61 \pm 0,37 \text{ mg L}^{-1}$) **(Tabla 5.11)** con concentraciones finales de $7,55 \pm 0,76$, $7,31 \pm 1,10$, $6,43 \pm 0,45$ y $6,59 \pm 0,91 \text{ mg L}^{-1}$ para T5, T3, T1 y T2 **(Tabla 5.14)**. Estos dos últimos tratamientos (T1 y T2) no presentaron diferencias entre ellos y se destacaron porque corresponden a los suelos biofertilizados y fueron los tratamientos en donde se presentó el mayor contenido de P los bulbos ($1,25 \pm 0,13$ y $1,38 \pm 0,14 \text{ mg bulbo}^{-1}$, respectivamente) **(Tabla 5.10)**. Las BPS estudiadas se caracterizan por su capacidad para producir ácidos orgánicos y fosfatasa que participan en los procesos de solubilización y mineralización del P, liberándolo en la solución del suelo en forma de iones fosfato (H_2PO_4^+ , HPO_4^{2-}) [10,34,63]. La información obtenida en los análisis de suelo es consistente con la reportada en la **Tabla 5.11**. en donde se observa que, a pesar de no haber obtenido diferencias significativas en la mayoría de variables, el peso fresco total de T1 fue mayor que en todos los tratamientos ($25,57 \pm 1,14 \text{ g}$), seguido por T2 ($22,80 \pm 1,00 \text{ g}$) y entre ellos hubo diferencias significativas ($p < 0,05$), indicando una mayor

asimilación en los nutrientes en T1, viéndose reflejado en el crecimiento de las plantas de *A. cepa* L. de este tratamiento.

El P soluble presentó mayor variación en el control, pero menor absorción en el bulbo de *A. cepa* L., por posible precipitación con Ca^{2+} o Mg^{2+} . El T4 con BC 2 % presentó alto contenido de Ca^{2+} y alto P total, alto P extractable y alto P en solución, pero el contenido de P en bulbo fue menor con respecto a los demás tratamientos.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC), se relaciona con la cantidad de cargas negativas que están disponibles en la fracción sólida del suelo para retener e intercambiar los nutrientes. La CIC final para los 6 tratamientos estuvo entre $29,1 \pm 1,46$ y $30,2 \pm 1,39$ meq 100g^{-1} , y la mayor variación se presentó en T1 ($-0,58 \pm 0,47$ meq 100g^{-1}), indicando un aumento en las cargas negativas del suelo, que conlleva a una mayor concentración de bases del complejo de cambio en la solución del suelo, principalmente Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , y K^{+} . Una menor variación en las concentraciones de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^{+} , en términos generales para cualquiera de los tratamientos indica que hubo una mejor asimilación de nutrientes en planta.

Los valores de la relación $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ en el suelo oscilaron entre $24,7 \pm 1,6$ y $27,7 \pm 1,9$ indicando deficiencia de Mg^{2+} en todos los tratamientos pues la relación óptima debe estar alrededor de 5 [64]. La mayor variación se presentó en T2 ($7,05 \pm 0,64$) con diferencias entre tratamientos (Tabla 5.11). Resultado que es consistente con la relación $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ obtenida en los bulbos de las cebollas de T2 en donde el valor de la relación fue el más alto de todos los tratamientos ($9,79 \pm 0,37$), sin embargo, no se presentaron diferencias entre tratamientos para esta variable (Tabla 5.13).

El tratamiento que tuvo la menor variación en la saturación de humedad, debido a que el suelo está reteniendo menos agua es T1 lo que estaría relacionado con el mayor crecimiento de la planta (Tabla 5.11).

La variación en la CE fue mayor en T1 y T6 indicando menor reducción en la salinidad del suelo con respecto a los demás tratamientos.

Tabla 5.11. Variación de las características físicas y químicas del suelo (valor inicial-valor final) después del cultivo de *A. cepa* L., en materas

Trat	Descripción del tratamiento	pH	CE	Densidad g cc ⁻¹) ^{ns}	CO (%) ^{ns}	MO (%) ^{ns}
1	Abundagro® + 5% Biochar + BPS	-0,25 ± 0,01 d	0,33 ± 0,03 a	0,07 ± 0,01	-2,17 ± 0,14	-3,74 ± 0,23
2	Abundagro® + 2% Biochar + BPS	0,36 ± 0,01 a	0,16 ± 0,07 ab	0,02 ± 0,03	-0,81 ± 0,42	-1,39 ± 0,72
3	Abundagro® + 5% Biochar solo	-0,29 ± 0,02 d	0,32 ± 0,03 ab	0,03 ± 0,04	-1,42 ± 0,91	-2,35 ± 1,61
4	Abundagro® + 2% Biochar solo	-0,04 ± 0,02 c	0,22 ± 0,05 ab	0,07 ± 0,02	-1,81 ± 0,39	-3,11 ± 0,67
5	Abundagro®	-0,11 ± 0,01 cd	0,27 ± 0,03 b	0,03 ± 0,01	-1,10 ± 0,22	-1,92 ± 0,38
6	Agua	0,15 ± 0,01 b	0,33 ± 0,03 a	0,03 ± 0,02	-1,38 ± 0,19	-2,27 ± 0,23
CV (%)		-826,50	-25,85	-52,60	-33,72	-34,25
Trat	Descripción del tratamiento	N (%) ^{ns}	K (mg Kg ⁻¹) ^{ns}	Na (mg Kg ⁻¹)	Ca (mg Kg ⁻¹)	Mg (mg Kg ⁻¹)
1	Abundagro® + 5% Biochar + BPS	-0,18 ± 0,01	-48,33 ± 13,76	97,33 ± 5,63 ab	1313,33 ± 93,33 c	16,83 ± 1,76 b
2	Abundagro® + 2% Biochar + BPS	-0,07 ± 0,03	-10,00 ± 20,33	79,33 ± 6,63 b	1810,00 ± 88,51 ab	5,50 ± 3,73 c
3	Abundagro® + 5% Biochar solo	-0,11 ± 0,08	-28,33 ± 20,88	105,00 ± 3,21 ab	1548,33 ± 87,99 abc	30,17 ± 1,25 a
4	Abundagro® + 2% Biochar solo	-0,15 ± 0,03	15,00 ± 21,72	78,67 ± 10,39 b	1863,33 ± 115,06 a	13,50 ± 1,52 bc
5	Abundagro®	-0,09 ± 0,02	-33,33 ± 19,61	118,00 ± 4,47 a	1481,67 ± 103,42 abc	18,33 ± 1,36 b
6	Agua	-0,12 ± 0,02	11,67 ± 24,14	83,67 ± 5,90 ab	1375,00 ± 98,65 bc	5,50 ± 2,36 c
CV (%)		-33,86	-164,13	16,98	14,45	61,74
Trat	Descripción del tratamiento	Fe (mg Kg ⁻¹)	B (mg Kg ⁻¹)	P tot (mg Kg ⁻¹)	P ext (mg Kg ⁻¹)	P sol (mg Kg ⁻¹)
1	Abundagro® + 5% Biochar + BPS	5,92 ± 0,06 b	0,10 ± 0,03 b	309,08 ± 51,98 b	57,80 ± 4,95 b	6,57 ± 0,18 b
2	Abundagro® + 2% Biochar + BPS	2,55 ± 0,05 e	0,08 ± 0,03 b	315,87 ± 51,35 b	67,60 ± 3,26 ab	6,61 ± 0,37 b
3	Abundagro® + 5% Biochar solo	3,24 ± 0,01 d	0,14 ± 0,03 ab	454,80 ± 73,23 ab	60,03 ± 2,38 b	5,19 ± 0,45 bc
4	Abundagro® + 2% Biochar solo	3,58 ± 0,01 c	0,12 ± 0,03 b	748,43 ± 68,30 a	82,43 ± 2,87 a	8,50 ± 0,25 a
5	Abundagro®	1,68 ± 0,07 f	0,05 ± 0,02 b	453,72 ± 64,29 ab	77,93 ± 4,38 a	4,65 ± 0,31 c
6	Agua	8,27 ± 0,01 a	0,24 ± 0,01 a	201,95 ± 104,20 b	74,93 ± 4,31 ab	9,60 ± 0,29 a
CV (%)		58,17	53,35	45,92	14,20	27,71
Trat	Descripción del tratamiento	Mn (mg Kg ⁻¹)	Cu (mg Kg ⁻¹)	Zn (mg Kg ⁻¹)	S (mg Kg ⁻¹)	CIC
1	Abundagro® + 5% Biochar + BPS	41,77 ± 1,61 ab	0,31 ± 0,02 b	2,64 ± 0,52 a	82,68 ± 4,99 a	-0,58 ± 0,47 c
2	Abundagro® + 2% Biochar + BPS	16,68 ± 2,12 c	0,14 ± 0,04 bc	-1,61 ± 0,24 c	45,95 ± 6,17 bc	2,03 ± 0,42 b
3	Abundagro® + 5% Biochar solo	36,08 ± 1,35 ab	0,17 ± 0,02 bc	-0,90 ± 0,29 c	63,03 ± 3,39 ab	0,83 ± 0,42 bc
4	Abundagro® + 2% Biochar solo	35,13 ± 1,71 ab	0,21 ± 0,02 bc	1,18 ± 0,19 ab	55,63 ± 6,99 ab	5,43 ± 0,60 a
5	Abundagro®	29,45 ± 1,89 bc	0,08 ± 0,02 c	-0,73 ± 0,54 bc	65,70 ± 6,08 ab	1,63 ± 0,57 bc
6	Agua	45,02 ± 4,28 a	1,40 ± 0,04 a	1,94 ± 0,29 a	19,50 ± 8,02 c	1,43 ± 0,44 bc
CV (%)		29,62	130,55	410,54	38,59	111,37
Trat	Descripción del tratamiento	SatHum	Ca/Mg	Ca/K ^{ns}	Mg/K	Ca/Mg/K ^{ns}
1	Abundagro® + 5% Biochar + BPS	6,53 ± 0,54 b	2,63 ± 0,67 bc	7,07 ± 0,56	0,15 ± 0,04 ab	7,32 ± 0,57
2	Abundagro® + 2% Biochar + BPS	9,12 ± 0,56 a	7,05 ± 0,64 a	7,23 ± 1,09	-0,74 ± 0,04 c	7,28 ± 1,12
3	Abundagro® + 5% Biochar solo	8,82 ± 0,49 a	0,87 ± 0,64 c	6,67 ± 0,87	0,26 ± 0,05 a	6,85 ± 0,90
4	Abundagro® + 2% Biochar solo	9,12 ± 0,45 a	5,57 ± 0,52 ab	6,48 ± 1,00	0,06 ± 0,04 b	6,47 ± 1,04
5	Abundagro®	8,98 ± 0,12 a	3,08 ± 0,37 bc	7,33 ± 0,64	0,17 ± 0,02 ab	7,48 ± 0,65
6	Agua	7,72 ± 0,37 ab	5,65 ± 0,78 ab	4,65 ± 1,28	0,01 ± 0,04 b	4,65 ± 1,35
CV (%)		12,50	55,99	15,17	-2591,07	15,87

Tabla 5.11 (Continuación) Variación de las características del suelo (valor final-valor inicial) de las condiciones iniciales del suelo después del cultivo de *A. cepa* L., en materas

Trat	Descripción del tratamiento	SatMg	SatNa	SatK ^{ns}	SatCa ^{ns}
1	Abundagro [®] + 5% Biochar + BPS	-0,31 ± 0,09 ab	0,66 ± 0,08 ab	-1,24 ± 0,13	0,93 ± 0,16
2	Abundagro [®] + 2% Biochar + BPS	-0,77 ± 0,09 c	0,19 ± 0,11 b	-1,15 ± 0,23	1,62 ± 0,35
3	Abundagro [®] + 5% Biochar solo	-0,09 ± 0,07 a	0,64 ± 0,06 ab	-1,24 ± 0,21	0,60 ± 0,28
4	Abundagro [®] + 2% Biochar solo	-0,60 ± 0,06 bc	0,19 ± 0,14 b	-1,02 ± 0,19	1,20 ± 0,12
5	Abundagro [®]	-0,31 ± 0,04 ab	0,85 ± 0,05 a	-1,16 ± 0,13	0,72 ± 0,12
6	Agua	-0,53 ± 0,08 bc	0,46 ± 0,09 ab	-0,80 ± 0,25	0,97 ± 0,36
	CV (%)	-56,04	53,91	-15,07	36,29

Las letras diferentes al lado de los números muestran los grupos heterogéneos según la prueba de Tukey e indican que hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). ns = no hay diferencias significativas ($p > 0,05$). CV = coeficiente de variación

En cuanto a las correlaciones presentadas entre los nutrientes del suelo y las variables de crecimiento de la cebolla, se encontró que en la variable peso seco de la raíz los factores que tuvieron influencia fueron la relación Mg^{2+}/K^+ , la saturación de humedad y la saturación de Mg. La longitud de la raíz se correlacionó positivamente con Ca^{2+}/K^+ , $Ca^{2+}/Mg^{2+}/K^+$ y la CE. Para el peso fresco de la hoja los factores que influenciaron fueron la relación Mg^{2+}/K^+ y el contenido de S en suelo. El número de hojas estuvo influenciado por el contenido de Mg^{2+} y la saturación del mismo elemento en el suelo. El peso fresco, el peso seco total de la cebolla y el peso seco del bulbo estuvieron relacionados con la concentración de S, las dos últimas variables adicionalmente se relacionaron con la concentración de Mn^{2+} . El peso seco de las hojas estuvo influenciado por el contenido de Mn^{2+} (Tabla 5.12).

La longitud de la raíz (LR) presentó correlación negativa con el K^+ y la MO (%), información que es consecuente ya que el suelo usado en todos los tratamientos presentaba alto contenido de nutrientes, condiciones en las que la planta invierte menos energía en la formación de bioamasa radical y puede asimilarlos a partir de las formas disponibles presentes en la rizósfera. El número de hojas (NH) presentó correlación negativa con la relación Ca^{2+}/Mg^{2+} en suelo debido a que estos dos nutrientes estimulan el desarrollo de la raíz y afectan la relación biomasa aérea/biomasa radical que en general es mayor a 1.

Tabla 5.12. Correlaciones entre atributos del suelo y variables asociadas al crecimiento de plantas de cebolla.

	PSR	LR	PFH	NH	PFT	PSB	PSH	PST
Psol	-0,87*							
Mg²⁺/K⁺	0,87*		0,86*					
SatHum	0,89*							
SatMg	0,82*			0,86*				
K⁺		-0,87*						
Ca²⁺/K⁺		0,97**						
Ca²⁺/Mg²⁺/K⁺		0,97**						
MO (%)		-0,82*						
CE		0,83*						
SatK		-0,95**						
S			0,84*		0,84*	0,93**		0,90*
Ca²⁺/Mg²⁺				-0,85*				
Mg²⁺				0,93**				
Mn²⁺						0,91*	0,81*	0,90*

* Significancia <0,05 según Prueba de t

** Significancia <0,01 según Prueba de t

5.4. Discusión

5.4.1. Efecto del bioinoculante en la germinación de semillas de *A. cepa* L., en cámara húmeda y crecimiento en semillero

El porcentaje de germinación en cámara húmeda es una prueba rápida (5 días) que permite determinar si un bioinoculante afecta positiva o negativamente a una semilla. Adicionalmente, es práctica frecuente hacer la inmersión de las semillas en suspensiones con microorganismos, agua o agua con compuestos osmoreguladores (osmoacondicionamiento) con el fin de acelerar el proceso de germinación, determinar la viabilidad de las semillas y promover el establecimiento rápido y sincronizado de las plántulas [65,66]. De acuerdo con los resultados que se presentan en la **Fig. 5.6**, el consorcio (*Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., y *Kosakonia* sp.) y el cocultivo (*Serratia* sp., y *Pseudomonas* sp.), favorecieron la germinación de semillas (98 y 90 %), siendo superior a las cepas por separado y los controles. Teniendo en cuenta que la disponibilidad de P es un paso limitante en la nutrición de las plantas, lo que sugiere una contribución fundamental de las BPS a la nutrición de las plantas; en consecuencia, mejora el rendimiento del crecimiento [67–69]. Este efecto está asociado al aporte de nutrientes, posibles sustancias promotoras de crecimiento vegetal producidas por las tres bacterias cuando se cultivan en consorcio o cocultivo y al fósforo solubilizado por las mismas, ya que hay evidencia que apoya la idea de que la fertilización con BPS mejora del crecimiento de las plantas, debido a que varios microorganismos del suelo, incluidas las bacterias, mejoran el suministro de P a las plantas como consecuencia de su capacidad para la solubilización de P. [Sridevi & Ramakrishnan, \(2010\)](#), demostraron que la coinoculación de bacterias del género *Azospirillum* y hongos de micorriza arbuscular, favoreció la germinación de semillas de *A. cepa* L., el establecimiento de semilleros y suelo, debido a la producción combinada de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y a la mayor disponibilidad de nutrientes como el fósforo [70].

Por otro lado, el efecto de ciertos compuestos como acondicionadores osmóticos para favorecer la germinación de las semillas fue reportado por [Marín et al., \(2007\)](#). En su trabajo demostraron que el grado de vigor de las semillas de cebolla y el porcentaje de emergencia de las mismas varía en función del agente usado para el osmoacondicionamiento, potencial osmótico y período de tratamiento [65]. [Zhao et al., \(2018\)](#) reportaron que algunos factores, como el deterioro leve de la testa o la inactivación enzimática de la semilla pueden ser reversibles, lo que significa que una

cierta pérdida del vigor puede ser recuperado mediante tratamientos físicos, químicos y biológicos, como la adición de bioinoculantes que contengan bacterias [43,71]. A diferencia de *Marín et al.*, (2007), en el presente trabajo aunque no se utilizaron acondicionadores osmóticos por separado, pero no se descarta la posibilidad de que el suministro de BPS en consorcio y cocultivo completo (microorganismos y compuestos residuales del medio, finalizada la producción a 6 horas) diluido en solución salina al 0,85 % (p/v) a una concentración de $8,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ pueda haber generado en la semilla procesos fisiológicos asociados con la pre-germinación, como captación de radicales libres, activación enzimática, y recuperación de membrana, que permitieron que la germinación de las semillas fuera superior al 90 % a los 5 días de evaluación [44,71]. Adicionalmente los ácidos orgánicos producidos por las BPS favorecen el ablandamiento de la testa, que a su vez promueve la emergencia de la plántula ya que se puede dar la alteración del contenido de agua y aumento de presión que puede afectar la testa.

El suelo empleado para las pruebas de germinación en semillero se caracterizó por ser franco arcilloso con altos contenidos de aluminio y hierro, que limitan la disponibilidad de P (**Tabla 5.1**). Las bacterias evaluadas tienen la capacidad de solubilizar P lo que explica el efecto benéfico en el crecimiento de las plántulas [52], siendo los tratamientos con el consorcio y el cocultivo los más eficientes y a pesar de que el suelo no fue suplementado con P, las bacterias tuvieron la capacidad de hacer disponible este elemento por medio de dos mecanismos. El primero es la solubilización a partir del P extractable presente en el suelo, asociado a fuentes inorgánicas de P y de esta forma proporcionaron P soluble en la solución del suelo para ser asimilado por las plántulas. El segundo mecanismo se asoció a la germinación de la semilla por medio de la mineralización de P a partir de P orgánico contenido en el endospermo de la semilla por acción de las fitasas, enzimas que pertenecen a un grupo especial de fosfatasas, que catalizan la liberación de fosfato del ácido fítico. La fitasa secuestra los grupos ortofosfato del anillo inositol del ácido fítico para producir fósforo inorgánico libre [72,73].

La concentración de P extractable en el suelo antes de la inoculación fue alta (250 mg kg^{-1}) y el potasio mostró valores de 289 mg kg^{-1} por lo que no se fertilizó el ensayo al momento de la siembra ya que los ácidos orgánicos producidos por las bacterias evaluadas podrían aumentar la disponibilidad de estos elementos [74].

En condiciones de semillero, las BPS en cocultivo y consorcio favorecieron el incremento de peso seco total en plántulas de *A. cepa* obteniéndose valores de 70 ± 4 y 69 ± 13 mg, con respecto a *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Kosakonia* sp. y el control en donde se obtuvieron valores de 50 ± 4 mg, 47 ± 7 mg, 35 ± 2 y $38 \pm 5,0$ mg. Se observó un efecto similar para la altura con valores de 20 ± 3 , $17,3 \pm 0,8$ cm, $13,8 \pm 0,2$, $11,7 \pm 0,5$, 10 ± 2 y $15,4 \pm 1,9$ cm de altura, para consorcio, cocultivo, *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Kosakonia* sp. y el control respectivamente (Fig. 5.7A). Lo anterior coincide con un estudio reportado por López *et al.*, (2017), quienes demostraron el uso de microorganismos eficientes como biofertilizantes en plantas de *Allium cepa* [75]. Batool & Iqbal, (2018), reportaron el uso de un consorcio de BPS como alternativa al uso de los fertilizantes químicos, demostrando la capacidad de éstas para producir reguladores de crecimiento vegetal tipo auxínico (ácido indol acético), sideróforos y amoniaco, con el consecuente aumento en la germinación de semillas y aumento en la longitud de la raíz y del brote en *Triticum aestivum* [76]. De acuerdo con Karlicic *et al.*, (2016) la producción de sideróforos puede afectar la disponibilidad de hierro de los compuestos asociados a metales pesados que contengan este elemento [77]. En su estudio los mismos autores comprobaron la capacidad de *Serratia liquefaciens*, *Micrococcus* sp., y *Serratia* sp., para quelar iones de Fe^{3+} y facilitar su absorción [77]. En concordancia con el estudio anterior, las BPS de la presente investigación demostraron tener la capacidad para promover la germinación y crecimiento de *A. cepa* L., que podría estar asociada también a la producción de sideróforos y reguladores de crecimiento vegetal.

Ahmad *et al.*, (2014), reportaron que el uso de BPS aisladas del suelo de diferentes cultivos podría mejorar el crecimiento de las plantas. Los resultados obtenidos en este estudio, demuestran el potencial de *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. y *Kosakonia* sp. en consorcio y *Pseudomonas* sp., y *Serratia* sp. en cocultivo, para aumentar el crecimiento de *A. cepa* y su posible efecto como promotoras de crecimiento vegetal [78].

Las BPS desempeñan un papel importante en la nutrición de las plantas a través del aumento en la disponibilidad de P soluble en el suelo para que sea absorbido por la planta y su uso es una contribución importante a la biofertilización de los cultivos agrícolas.

5.4.2. Efecto del bioinoculante sobre el crecimiento *A. cepa* L., en parcela

Algunos de los factores que pueden afectar el comportamiento de las bacterias en el suelo son el contenido de nutrientes, el tipo de suelo y la variedad de la especie vegetal hospedera [69]. Diversos géneros de bacterias capaces de solubilizar fósforo y promover el crecimiento de *Allium sativum* L. [79], *Brassica napus* [69], *Elaeis guineensis* Jacq. [19], *Oryza sativa* L. [18,80] y *Triticum aestivum* [1,81], han sido evaluados. Anzuay *et al.*, (2017) estudiaron el efecto de la inoculación simple y mixta de seis BPS (*Pantoea* sp., J49, *Bacillus* sp., L55, *Serratia* sp., S119, *Acinetobacter* sp., L176, *Enterococcus* sp., L191 y *Serratia* sp., J260 nativas de cultivos de *Arachis hypogaea* L., y *Zea mays* L. en el crecimiento de su hospedero. Como resultado, obtuvieron aumento en la germinación de semillas, crecimiento vegetal y contenido de P. En ese caso, las BPS mostraron capacidad para solubilizar y mineralizar fósforo, lo que las convirtió en potenciales biofertilizantes para estos cultivos [82]. Ahmad *et al.*, (2014), reportaron el uso de BPS aisladas del suelo de diferentes cultivos como posibles promotoras de crecimiento de las plantas [78]. En un estudio previo realizado por Blanco-Vargas *et al.*, (2020b) en el que se evaluó el efecto BPS (*Pseudomonas* sp., y *Serratia* sp.) sobre el crecimiento en *A. cepa* L., se observó incremento de peso seco total y la altura en plántulas de *A. cepa* L., al aplicar el co-cultivo bacteriano en concentraciones de $8,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ dos veces por semana durante 2 meses. Estos resultados se atribuyen a que los ácidos orgánicos producidos por las bacterias evaluadas aumentaron la liberación de P soluble a partir del P total presente en el suelo de cultivo [34].

El cultivo de *A. cepa* L., se caracteriza por requerir altas concentraciones de N, P y K^+ ($120/80/150 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ cosecha}^{-1}$, respectivamente) [27,53,83]. En las parcelas de este trabajo, la concentración de P extractable fue alta, (250 mg Kg^{-1}), sin embargo, la presencia de Fe^{3+} (42 mg kg^{-1}) y Al^{3+} (17 mg kg^{-1}) disminuyen su disponibilidad. Las altas dosis de fertilizante orgánico-mineral Abundagro[®], recomendadas por el productor, 200 Kg ha^{-1} , puede causar exceso de P en el suelo con la consecuente precipitación con otros nutrientes. Frecuentemente, el exceso del contenido de P en el suelo y las altas dosis aplicadas no representan un beneficio o incluso pueden afectar negativamente la productividad de los cultivos de cebolla [84]. En este estudio, las plantas tratadas con las mayores dosis de Abundagro[®] no presentaron el mayor crecimiento, ni siquiera aquellas que recibieron simultáneamente el bioinoculante.

Las plantas que no recibieron fertilización presentaron el menor crecimiento y contenido de P

en el bulbo, comportamiento similar al de aquellas que fueron tratadas con las menores dosis de Abundagro[®]. Pese a que la concentración de P extractable en el suelo antes de sembrar excedió el rango óptimo para la producción de bulbos, 129 a 168 mg Kg⁻¹, su baja concentración en forma soluble afectó el crecimiento de las plantas en los tratamientos sin BPS. Por el contrario, la aplicación del bioinoculante favoreció los resultados de variables vegetales de crecimiento evaluadas en el ensayo, incluyendo las de las plantas tratadas solamente con este producto (T13). La solubilización microbiana de P a partir de diferentes RP está ganando importancia, pues varios autores han reportado alta eficiencia del proceso ya que estos microorganismos tienen cortos tiempos de crecimiento lo que permite liberación de P soluble en lapsos de tiempo cortos [78,85–89]. Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran que el consorcio bacteriano formado por *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. y *Kosakonia* sp. produce diferentes ácidos orgánicos y enzimas fosfatasas, que al aumentar la concentración de P soluble, promueve el crecimiento de *A. cepa* L. Una de las características que favorece el proceso es su producción con una fuente de P inorgánico igual al del fertilizante utilizado en los ensayos de parcela.

Maghraoui *et al.*, (2016) reportan que las altas concentraciones de fósforo pueden inducir más rápido la producción de ácidos orgánicos [90]. Así mismo, Serna Posso *et al.*, (2017) afirman que es importante tener en cuenta que tanto la fuente de P, como el tipo de ácido producido y su concentración influyen en la liberación de fósforo. Según ellos, la solubilización del P a partir de P-Ca²⁺ es mayor que a partir de P-Al³⁺ y ésta a su vez mayor que a partir de P-Fe³⁺ [91]. La capacidad del bioinoculante de producir *in vitro* ácidos glucónico, cítrico y oxálico y de liberar P a partir de la RP que tiene aproximadamente 24 % de Ca²⁺ y 1 % de Al³⁺ permite aumentar la concentración de P soluble en el bioinoculante, en el fertilizante Abundagro[®] y en el suelo cultivado con cebolla y fertilizado con este producto en ciclos anteriores. La mezcla de fertilizante orgánico mineral y bioinoculante arrojó mejores resultados generales en el crecimiento de las plantas, resultados similares a los encontrados por Yoldas *et al.*, (2011), quienes evaluaron el efecto de fertilizantes orgánicos e inorgánicos en el crecimiento y contenido mineral en cebolla *A. cepa* L. [74] y por Yadav *et al.*, (2017), quienes aplicaron RP, compost y BPS. En este último estudio, se reporta que la relación 75:25 de compost + BPS y RP ocasionó la concentración máxima de P soluble y el mayor crecimiento de plantas de trigo, respecto a las plantas que se fertilizaron con compost sin BPS y RP [7,16]. En un ensayo previo de esta investigación, Moreno-Bayona *et al.*, (2019), evaluaron el efecto de la fertilización de *A. cepa* L., con un

consorcio de BPS conformado por *Pseudomonas* sp., *Kosakonia* sp. y *Serratia* sp., inmovilizadas en un BC que contenía aserrín de pino caribe (APC) y se determinó el efecto positivo de la aplicación de las BPS en el crecimiento de la planta después de cinco semanas de evaluación [32]. Al obtener concentraciones elevadas de biomasa bacteriana en el inoculante, éste se puede dosificar para que en campo quede en concentraciones entre 3,0 y 4,0 Log₁₀ UFC mL⁻¹ y se pueda favorecer el establecimiento de las bacterias en el suelo, debido a que la competencia con los microorganismos autóctonos del suelo es alta [66,92]. Las bacterias pueden aplicarse al suelo en co-cultivo y la interacción positiva o neutralista podría mantenerse [93], al igual que la interacciones *in vitro* observadas en las pruebas de interacción del presente estudio.

5.4.3. Efecto del biofertilizante sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en materas

La fertilización del cultivo de cebolla, se realiza sin un diagnóstico integral previo del suelo y se basa en la aplicación empírica de fertilizantes sólidos de origen inorgánico [29]. Álvarez-Hernández *et al.*, (2011) y Blanco & Lagos, (2017), reportan que la extracción de P por ciclo productivo es de 35 ± 5 Kg ha⁻¹ [29,55]. Cuando los fertilizantes fosfatados se aplican en cantidades excesivas provocan la fijación de P, caracterizada por la presencia de altas concentraciones de P en forma de minerales secundarios fosfatados [2]. Por eso, la fertilización debe estar asociada a la aplicación integral y balanceada de los elementos que necesita la planta [94]. El suelo para evaluar el efecto del biofertilizante en materas se seleccionó, como se mencionó previamente, de acuerdo con el contenido de P extractable (168 mg Kg⁻¹) y el pH (7,73) reportados en el análisis nutricional previo a la siembra (Tabla 5.5).

En relación a las concentraciones de biofertilizante y BC seleccionadas para ser evaluadas en este estudio, se determinaron en un estudio previo realizado con Moreno-Bayona *et al.*, (2019), en donde se evaluaron tres concentraciones de un bioproducto a base BC que contenía aserrín de pino caribe y BPS (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.) sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en concentraciones de 1, 2 y 5 % del bioproducto. Allí los pesos secos (mg) y las alturas (cm) de las cebollas fueron significativamente diferentes cuando se usó el bioproducto al 2 y 5 %. Las propiedades del BC como portador microbiano fueron demostradas por altas poblaciones de BPS, disposición de biopelícula de microorganismos en el bioproducto y recuperación de bacterias del sustrato utilizado para la siembra de plantas en los tratamientos en los que se evaluó

el efecto del bioproducto [32]. Por esta razón se tomó la decisión de evaluar el efecto de estas dos concentraciones de biofertilizante (2 y 5 %) sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en materas.

Durante los últimos años el uso de bioinoculantes para mejorar el rendimiento de los cultivos y la eficiencia de la absorción de nutrientes ha tomado mayor relevancia, ya que para lograr la eficacia en campo y por lo tanto, el éxito comercial, se debe lograr la calidad y estabilidad deseadas. Los dos aspectos clave para el desarrollo de inoculantes exitosos a nivel de cultivo en parcelas de campo son la selección de la cepa o la mezcla de cepas y una adecuada formulación, incluyendo el portador de las bacterias [1,2,89,95]. El presente estudio aborda los dos aspectos mencionados, al evaluar el biofertilizante sobre el crecimiento de *A. cepa* L., en materas, usando suelo agrícola proveniente del Departamento de Boyacá en donde se cultiva esta especie vegetal. Las plantas de cebolla se cosecharon 4 meses posteriores al trasplante. En la **Tabla 5.9** se presenta el contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en bulbo (mg bulbo^{-1}) al finalizar el experimento. Allí se observó mayor concentración de estos nutrientes en los bulbos de T1 y T2, lo que indicó que el biofertilizante influye positivamente en la absorción de nutrientes. Las BPS han sido reportadas como microorganismos simbióticos mutualistas, que colonizan las raíces de la mayoría de las plantas de cultivos y tienen la capacidad de mejorar la movilidad y absorción de nutrientes a nivel de planta [2,96,97]. Rafique *et al.*, (2019) reportan que la abundancia de microorganismos puede aumentar en suelos modificados con BC debido a la estructura porosa del material que puede ser un hábitat potencial para bacterias, aumentando el área de superficie para la absorción de nutrientes [31]. Algunos estudios han mostrado efectos positivos de la adición de BC en el crecimiento de las plantas; sin embargo, las respuestas de las plantas varían para diferentes suelos y en condiciones óptimas puede que no haya beneficios medibles con respecto a la biomasa vegetal [98–100].

La inoculación del suelo con biofertilizantes que contengan BPS promueve el crecimiento de las plantas [40]. En el presente estudio, aunque no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto al peso fresco total (PFT) (g), peso seco total (PST) (g) y medidas (LR, AB, DB) (mm) de las cebollas, la tendencia de mayores pesos y longitudes se observaron en los tratamientos que contenían biofertilizante (**Tabla 5.9**). Lo anterior puede ser atribuido a la disponibilidad de nutrientes como N y P debido a la modificación del suelo por la adición de biofertilizante, en donde se pueden producir varios compuestos orgánicos en la rizósfera que,

junto con la mayor área de raíces producida como respuesta a la presencia de reguladores de crecimiento vegetal como ácido indol acético (IAA), favorecen la absorción de formas disponibles de estos elementos [2,40,101].

Balemi *et al.*, (2007) reportaron aumento significativo en el porcentaje de nutrientes en el bulbo de *A. cepa* L., en especial N, como resultado de la inoculación con cepas eficientes, debido a reguladores de crecimiento producidos por *Azotobacter* sp., lo cual facilitó mejor desarrollo de las raíces, conduciendo a una mayor absorción de nutrientes [102]. En el presente estudio, un mayor contenido de N en bulbo en los tratamientos que contenían el biofertilizante (T1 y T2) con respecto a los demás tratamientos puede asociarse a una raíz mejor desarrollada lo que se demostró con el peso fresco (g) y el peso seco (g).

Los nutrientes como potasio y boro, requeridos para el crecimiento de *A. cepa* L., están en concentraciones medias y bajas lo que podría limitar el desarrollo de la hortaliza. Los contenidos de amonio fueron altos y los nitratos bajos. Esta variación entre formas de nitrógeno puede asociarse con el uso de fertilizantes químicos que se rotan semestralmente en los cultivos y que pueden tener una tasa de liberación de nutrientes mucho mayor que los fertilizantes orgánicos [103].

Prendergast *et al.*, (2014), indicaron que las raíces son el primer punto de contacto entre las partículas de BC y las plantas en crecimiento a través de la influencia sobre la disponibilidad de nutrientes [104]. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación, en donde se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos para la variable peso seco de la raíz, en los tratamientos que contenían biofertilizante (T1 y T2), seguidos por los tratamientos en los que se evaluó el BC solo (T3 y T4), (Tabla 5.9).

Rafique *et al.*, (2017) reportaron en su estudio que la inoculación con BPS mejoró el crecimiento de las plantas de maíz con respecto a la longitud de la raíz y del brote promoviendo significativamente el crecimiento de las plantas [40]. Al igual de lo que se observó en este estudio, la longitud y peso de la raíz y el peso fresco total de las plantas fue mayor en los tratamientos en los cuales se adicionó el biofertilizante (T1 y T2), (Tabla 5.9).

La adición de biofertilizante al suelo, mostró en T1 (biofertilizante al 5 %) el aumento en la capacidad de intercambio catiónico (CIC) ($29,6 \pm 1,14$) y el pH ($7,69 \pm 0,04$) (**Tabla 5.5, 5.11 y 5.13**). El incremento en el pH del suelo debido a la aplicación de BC puede atribuirse a la acumulación de cenizas que generalmente están compuestas por carbonatos de metales alcalinos ($-\text{Na}^+$, $-\text{K}^+$) y alcalinotérreos ($-\text{Mg}^{2+}$, $-\text{Ca}^{2+}$), fosfatos y pequeñas cantidades de compuestos orgánicos e inorgánicos [105].

Tekeste *et al.*, (2018) reportaron un pH de 6,68 del suelo evaluado en su estudio que tiende a la neutralidad y es óptimo para el crecimiento del cultivo de cebolla [83]. Lo que es consistente con los pH del suelo evaluado en el presente estudio, que también estuvieron cerca a la neutralidad. Cuando el pH presenta valores alrededor de la neutralidad, la carga positiva de óxidos de Fe^{3+} y Al^{3+} disminuye por lo tanto la afinidad por el P. Adicionalmente, el aumento del pH del suelo debido a un aumento en los óxidos de metales alcalinos (Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+) puede disminuir la solubilidad del Al^{3+} reactivo y por lo tanto, reducir la inmovilización de P [63]. Hardie *et al.*, (2015) sugieren que los cambios en la disponibilidad de P y la lixiviación después de la aplicación de BC en el suelo resultan de una combinación de mecanismos fisicoquímicos, como la modificación del pH del suelo, formación de complejos de fosfato metálico, promoción de la actividad microbiana y aumento de la mineralización de fosfato [106].

En relación con otros macronutrientes como N y K^+ , se observó aumento en la concentración final en suelo, lo que quedó evidenciado por el signo negativo en la variación de las concentraciones reportadas en la **Tabla 5.11**. Rehman *et al.*, (2018) demostraron que el P extractable en el suelo y otros macronutrientes aumentaron antes y después de la cosecha de trigo con la aplicación de BC y que la respuesta depende del tipo de suelo, el tiempo de cultivo y la concentración de biochar formulada en el suelo [107].

El análisis del suelo posterior a la cosecha mostró el efecto de los tratamientos en el pH. Observándose mayor variación con tendencia a la alcalinidad en los tratamientos en los que se usó biofertilizante y los tratamientos que incluyeron BC. Rehman *et al.* (2018) demostraron al igual que en el presente estudio, que el BC cambia ligeramente el pH del suelo con tendencia a la alcalinidad [107]. Borno *et al.*, (2018) mencionan que la saturación de bases está relacionada positivamente con el pH del suelo debido a que un valor de saturación de bases alta indicaría

que los sitios de intercambio de una partícula de suelo están dominadas por iones no ácidos [63]. Resultados similares se obtuvieron en este estudio. En la **Tabla 5.11** se presentan los valores negativos para saturación de Mg^{2+} y Ca^{2+} en todos los tratamientos, indicando aumento de estos elementos al finalizar la evaluación del biofertilizante en materas. Mientras que para Na^+ y Ca^{2+} no hubo aumento de estas bases en el suelo analizado después de la cosecha. [Mukhtar et al., \(2017\)](#) también documentaron que el uso combinado de fosfato inorgánico, cepas bacterianas y algunos materiales portadores son benéficos para mejorar el pH del suelo y el área superficial de las raíces a través de una mayor proliferación de las raíces [1].

5.5. Conclusiones

Las BPS evaluadas en este estudio, tienen la capacidad de solubilizar P de RP a través de la producción de ácidos orgánicos, en especial ácido glucónico el cual se produjo en una proporción de 77,6 % del 100 % de los ácidos producidos. Además, producen enzimas fosfatasas que están implicadas en la mineralización de P orgánico y también pueden estar implicadas en el proceso de germinación de semillas pues algunas de las fosfatasas pueden ser fitasas que participan en el proceso mineralización de fitato presente en la testa de las semillas, generando una aceleración en el proceso de emergencia de la plántula.

Los efectos del biofertilizante producido en este estudio se asociaron al aumento de la germinación, el crecimiento de plántulas, la asimilación de nutrientes y crecimiento de cebolla debido a que las BPS inmovilizadas en BC promueven la movilización de nutrientes particularmente P, durante el cultivo de *Allium cepa* L. Por lo anterior se presentan los beneficios de un nuevo producto basado en bacterias naturalmente asociadas con cebolla y un material orgánico que además de servir como portador bacteriano tiene efectos de aumento de área de adsorción de nutrientes altamente reactivos disminuyendo su lixiviación o su precipitación con otros nutrientes y fijación a la matriz sólida del suelo.

El consorcio de BPS presentó efecto biofertilizante sobre el cultivo de *A. cepa* L. dado que, en el experimento en parcelas el contenido de P total en bulbo en el mejor tratamiento (T4) fue de 15,21 mg bulbo⁻¹ y en el experimento de la evaluación del efecto del biofertilizante en materas, los bulbos de los tratamientos T1 y T2 en los cuales se evaluó el biofertilizante (BC/BPS) presentaron concentración de P total de $1,25 \pm 0,13$ y $1,38 \pm 0,14$ mg bulbo⁻¹, respectivamente. En los tratamientos mencionados anteriormente se evaluó el consorcio de BPS y estos presentaron los mayores contenidos de P en bulbo.

5.6. Productos científicos derivados del objetivo específico 3

5.6.1. Artículos científicos

Como productos derivados de la primera parte del presente capítulo se publicaron dos artículos. El primero (2020) correspondió a la evaluación del efecto del bioinoculante compuesto por el consorcio de BPS (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., y *Kosakonia* sp.) en *Allium cepa* L., a escala de parcela. El segundo (2020) correspondió a la evaluación del efecto del bioinoculante compuesto por el cocultivo de BPS (*Pseudomonas* sp., y *Serratia* sp.) en el cultivo de *A. cepa* L., a escala de semillero. Las citas se presentan a continuación y también se presentan en el [capítulo 3](#).

Consortio: Blanco-Vargas A, Rodríguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, Díaz-Ariza LA, Edna V. Gutiérrez-Romero, Claudia M. Rivera-Hoyos, Leidy D. Ardila-Leal, Aura M. Pedroza-Rodríguez. Effect of bioinoculant (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., and *Kosakonia* sp.) on *Allium cepa* L., at plot scale. *Universitas Scientiarum*. 2020. *Under Review*

Co-cultivo: Blanco-Vargas A, Rodríguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Garzón-Jaramillo R, Pedroza-Camacho LD, Poutou-Piñales RA, Rivera-Hoyos CM, Díaz-Ariza LA, Pedroza-Rodríguez AM. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L., growth promotion. *Heliyon*. 2020; 6: e05218. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05218

Adicionalmente se está preparando un artículo que presenta la evaluación de las BPS seleccionadas en el [capítulo 3](#), como biocontroladores. El artículo se encuentra en proceso de escritura y está relacionado con los resultados obtenidos de la tesis de pregrado del [siguiente numeral \(5.6.2\)](#). La cita preliminar se presenta a continuación.

Salej Vargas PA, Blanco Vargas A, Peña Carranza L, Castillo Carvajal LC, Rodriguez MX, Pedroza Rodríguez AM. Evaluación de *Trichoderma* sp. y bacterias fosfatosolubilizadoras inmovilizadas en biochar como biocontroladores de hongos asociados con la pudrición de *Allium cepa* L. *In writing*.

5.6.2. Formación de talento humano: Trabajo de Grado de pregrado codirigido, asociado al objetivo específico 3

- Salej P. Evaluación de *Trichoderma* sp. y bacterias Gram negativas como posibles biocontroladores in vitro de hongos asociados con la pudrición de bulbo de *A. cepa* L. Carrera de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 2019.

Adicionalmente se asocian las tesis de pregrado de la carrera de Microbiología Industrial citadas en el [capítulo 3 numeral 3.6.2](#) y en el [capítulo 4 numeral 4.11.2](#).

5.6.3. Participación en eventos científicos

- Participación en modalidad de poster en el XLI Encuentro Nacional de La Ingeniería Química, el Desarrollo Nacional y la Responsabilidad Social, de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. AMIDIQ. Evento que se llevó a cabo del 22 al 24 de octubre de 2020 en la ciudad de Ixtapa Zihuatanejo, Gro., México.



5.7. Referencias

1. Mukhtar S, Shahid I, Mehnaz S, Malik KA. Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Microbiological Research*. 2017;205: 107–117. doi:10.1016/J.MICRES.2017.08.011
2. Lobo CB, Juárez Tomás MS, Viruel E, Ferrero MA, Lucca ME. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*. 2019;219: 12–25. doi:10.1016/j.micres.2018.10.012
3. De Oliveira Mendes G, Lopez Zafra D, Bojkov Vassilev N, Ribeiro Silva I, Ribeiro JI, Dutra Costa M. Biochar enhances *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluoride toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014;80: 3081–3085. doi:10.1128/AEM.00241-14
4. Beheshti M, Etesami H, Alikhani HA. Interaction study of biochar with phosphate-solubilizing bacterium on phosphorus availability in calcareous soil. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 2017. doi:10.1080/03650340.2017.1295138
5. Solanki M, Kundu BS, Nehra K. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. *Annals of Agrarian Science*. 2018;16: 458–463. doi:10.1016/j.aasci.2018.05.007
6. Wei Y, Zhao Y, Shi M, Cao Z, Lu Q, Yang T, et al. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*. 2018;247: 190–199. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.092
7. Yadav H, Fatima R, Sharma A, Mathur S. Enhancement of applicability of rock phosphate in alkaline soils by organic compost. *Applied Soil Ecology*. 2017;113: 80–85. doi:10.1016/j.apsoil.2017.02.004
8. Vassilev N, Mendes G, Costa M, Vassileva M. Biotechnological Tools for Enhancing Microbial Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphates. *Geomicrobiology Journal*. 2014;31: 751–763. doi:10.1080/01490451.2013.822615
9. Krishnaraj PU, Dahale S. Mineral phosphate solubilization: Concepts and prospects in sustainable agriculture. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 2014;80: 389–405. doi:10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55116
10. Blanco-Vargas A, Rodriguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, Diaz-Ariza LA, et al. Effect of bioinoculant (*Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., and *Kosakonia* sp.) on *Allium cepa* L. at plot scale. *Universitas Scientiarum*. 2020a. doi:In review
11. Munda S, Shivakumar BG, Rana DS, Gangaiah B, Manjaiah KM, Dass A, et al. Inorganic phosphorus along with biofertilizers improves profitability and sustainability in soybean

- (Glycine max)-potato (*Solanum tuberosum*) cropping system Production and hosting by Elsevier. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2018;17: 107–113. doi:10.1016/j.jssas.2016.01.008
12. Zhu J, Li M, Whelan M. Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of the Total Environment*. 2018;612: 522–537. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.095
 13. Beltran Pineda ME. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 2014;15: 101–113.
 14. Sashidhar B, Podile AR. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Journal of Applied Microbiology*. 2010;109: 1–12. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04654.x
 15. Jones D, Oburger E. Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. Phosphorus in Action. 2011. pp. 169–198. doi:10.1007/978-3-642-15271-9
 16. Behera BC, Yadav H, Singh SK, Mishra RR, Sethi BK, Dutta SK, et al. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15: 169–178. doi:10.1016/j.jgeb.2017.01.003
 17. Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove-A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014;3: 97–110. doi:10.1016/j.bcab.2013.09.008
 18. Rasul M, Yasmin S, Zubair M, Mahreen N, Yousaf S, Arif M, et al. Phosphate solubilizers as antagonists for bacterial leaf blight with improved rice growth in phosphorus deficit soil. *Biological Control*. 2019;136. doi:10.1016/j.biocontrol.2019.05.016
 19. Acevedo E, Galindo-Castañeda T, Prada F, Navia M, Romero M. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology*. 2014;80: 26–33. doi:10.1016/j.apsoil.2014.03.011
 20. Swetha S, Padmavathi T. Study of Acid Phosphatase in Solubilization of Inorganic Phosphates by *Piriformospora indica*. *Polish Journal of Microbiology*. 2016;65: 407–412.
 21. Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*. 2014;26: 1–20. doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001
 22. Tabassum B, Khan A, Tariq M, Ramzan M, Saleem M, Khan I, et al. Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*. 2017;121: 102–117. doi:10.1016/j.apsoil.2017.09.030
 23. Petropoulos SA, Fernandes Â, Barros L, Ferreira ICFR, Ntatsi G. Morphological, nutritional and chemical description of “Vatikiotiko”, an onion local landrace from

Greece. *Food Chemistry*. 2015;182: 156–163. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.002

24. De la Fe Montenegro CF, Cardenas Travieso RM. Seed production of onion (*Allium cepa* L.), an experiences in Santa Cruz del Norte, Mayabeque. *Cultivos Tropicales*. 2014;35: 5–12.
25. Enciso Garay CR, Vera Ojeda PA, Santacruz Toledo AR, Gonzalez Villaba JD. Guia Tecnica Cultivo de Cebolla. San Lorenzo, Paraguay; 2019.
26. Oves M, Khan MS, Qari HA. Chromium-reducing and phosphate-solubilizing *Achromobacter xylosoxidans* bacteria from the heavy metal-contaminated soil of the Brass city, Moradabad, India. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019;16: 6967–6984. doi:10.1007/s13762-019-02300-y
27. Guerrero R. Fertilización de cultivos en clima frío. Segunda ed. Barranquilla, Colombia: Sáenz y Cia Ltda; 1998.
28. DANE. Boletín mensual: Isumos y factores asociados a la producción agropecuaria. 2016.
29. Álvarez Hernández JC, Venegas Flores S, Soto Ayala C, Chávez Vargas A, Zavala Sánchez L. Uso de fertilizantes químicos y orgánicos en cebolla (*Allium cepa* L.) en Apatzingán, Michoacán, México. *Avances de investigación agropecuaria*. 2011;15: 29–43.
30. Rafi MM, Krishnaveni MS, Charyulu PBBN. Phosphate-Solubilizing Microorganisms and Their Emerging Role in Sustainable Agriculture. *Soil and agriculture microbiology*. 2019. pp. 223–232. doi:10.1016/B978-0-12-816328-3.00017-9
31. Rafique M, Ortas I, Ahmed IAM, Rizwan M, Afridi MS, Sultan T, et al. Potential impact of biochar types and microbial inoculants on growth of onion plant in differently textured and phosphorus limited soils. *Journal of Environmental Management*. 2019;247: 672–680. doi:10.1016/j.jenvman.2019.06.123
32. Moreno-Bayona DA, Gómez-Méndez LD, Blanco-Vargas A, Castillo-Toro A, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, et al. Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by *Pleurotus ostreatus* for biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use. *PLoS ONE*. 2019;14: 25. doi:10.1371/journal.pone.0217100
33. Kalayu G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*. 2019. doi:10.1155/2019/4917256
34. Blanco-Vargas A, Rodriguez-Gacha LM, Sanchez-Castro N, Garzon-Jaramillo R, Rivera-Hoyos CM, Díaz-Ariza LA, et al. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*. 2020;6: e05218. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05218
35. Zheng B-X, Ding K, Yang X-R, Wadaan MAM, Hozzein WN, Peñuelas J, et al. Straw biochar increases the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacterial community for better rape (*Brassica napus*) growth and phosphate uptake. *Science of the Total Environment*. 2019;647: 1113–1120. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.454

36. Ajeng AA, Abdullah R, Ling TC, Ismail S, Lau BF, Ong HC, et al. Bioformulation of biochar as a potential inoculant carrier for sustainable agriculture. *Environmental Technology and Innovation*. 2020;20: 101168. doi:10.1016/j.eti.2020.101168
37. Egamberdieva D, Hua M, Reckling M, Wirth S, Bellingrath-Kimura SD. Potential effects of biochar-based microbial inoculants in agriculture. *Environmental Sustainability*. 2018;1: 19–24. doi:10.1007/s42398-018-0010-6
38. Cooper J, Greenberg I, Ludwig B, Hippich L, Fischer D, Glaser B, et al. Effect of biochar and compost on soil properties and organic matter in aggregate size fractions under field conditions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2020;295: 106882. doi:10.1016/j.agee.2020.106882
39. Lehmann J, Rillig MC, Thies J, Masiello CA, Hockaday WC, Crowley D. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biology and Biochemistry*. 2011;43: 1812–1836. doi:10.1016/j.soilbio.2011.04.022
40. Rafique M, Sultan T, Ortas I, Chaudhary HJ. Enhancement of maize plant growth with inoculation of phosphate-solubilizing bacteria and biochar amendment in soil. *Soil Science and Plant Nutrition*. 2017;63: 460–469. doi:10.1080/00380768.2017.1373599
41. Lou K, Rajapaksha AU, Ok YS, Chang SX. Pyrolysis temperature and steam activation effects on sorption of phosphate on pine sawdust biochars in aqueous solutions. *Chemical Speciation and Bioavailability*. 2016;28: 42–50. doi:10.1080/09542299.2016.1165080
42. Kaymak HÇ, Güvenç I, Yarali F, Dönmez MF. The Effects of Bio-priming with PGPR on Germination of Radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds under Saline Conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2009;33: 173–179. doi:10.3906/tar-0806-30
43. Liu D, Xie B, Dong C, Liu G, Hu D, Qin Y, et al. Effect of fertilizer prepared from human feces and straw on germination, growth and development of wheat. *Acta Astronautica*. 2018;145: 76–82. doi:10.1016/j.actaastro.2018.01.014
44. Arjona Diaz H, Guerrero Snachez A, Prieto Medina CO. Estudios de Osmoiniciacion de semillas de cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.). *Agronomía Colombiana*. 1998;15: 143–152.
45. Blanco-Vargas A, Ramírez-Sierra CF, Duarte Castañeda M, Beltrán-Villarraga M, Medina-Córdoba LK, Florido-Cuellar AE, et al. A novel textile wastewater treatment using ligninolytic co-culture and photocatalysis with TiO₂. *Universitas Scientiarum*. 2018;23: 437–464. doi:10.11144/javeriana.sc23-3.antw
46. Okalebo JR, Gathua KW, Woomer PL. Laboratory Methods of Soil and Plant Analysis: A Working Manual. Second edi. Nairobi, Kenya: TSBF-CIAT and SACRED Africa; 2002.
47. Bouyoucos GJ. Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analyses of Soils. *Agronomy Journal*. 1962;54: 464–465. doi:10.2134/agronj1962.00021962005400050028x
48. Walkley A, Black IA. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil*

Science. 1934;37: 29–38. doi:10.1097/00010694-193401000-00003

49. Kjeldahl J. A new method for the determination of nitrogen in organic bodies. *Zeitschrift für Analytische Chemie*. 1883;22: 366–382. doi:dx.doi.org/10.1007/BF01338151
50. Mehlich A. Determination of P, Ca, Mg, K, Na, NH₄. North Carolina; 1953.
51. Bray RH, Kurtz LT. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*. 1945;59: 39–46. doi:10.1097/00010694-194501000-00006
52. Jayathilake P, Reddy I, Srihari D, Reddy K. Productivity and soil fertility status as influenced by integrated use of n-fixing biofertilizers, organic manures and inorganic fertilizers in onion. *The Journal of Agricultural Science*. 2006;2: 46–58.
53. Mohamed AA, Eweda WEE, Heggo AM, Hassan EA. Effect of dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and sulphur-oxidising bacteria on onion (*Allium cepa* L.) and maize (*Zea mays* L.) grown in sandy soil under green house conditions. *Annals of Agricultural Sciences*. 2014;59: 109–118. doi:10.1016/j.aogas.2014.06.015
54. Murphy J, Riley JP. A single-solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1958.
55. Blanco C, Lagos J. Manual de producción de cebolla. Santiago, Chile; 2017. doi:0717-4829
56. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana NTC 5349. Calidad del suelo. Determinación de las bases intercambiables: los cationes calcio, magnesio, sodio y potasio. Método de extracción con acetato de amonio 1 N y pH 7. Bogotá, Colombia; 2008.
57. CODAZZI I. Métodos analíticos del laboratorio de suelos. Bogotá DC; 2006.
58. Olsen SR, Cole C V., Watanabe FS, Dean LA. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 1954;53: 1689–1699. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
59. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana NTC 5526. Determinación de micronutrientes disponibles: cobre, zinc, hierro y manganeso. Bogotá, Colombia; 2007.
60. Dulal Sarkar M, Muhammad Solaiman HA, Shah Jahan M, Rojoni RN, Kabir K, Hasanuzzaman M. Soil parameters, onion growth, physiology, biochemical and mineral nutrient composition in response to colored polythene film mulches. *Annals of Agricultural Sciences*. 2019;64: 63–70. doi:10.1016/j.aogas.2019.05.003
61. Villasanti C, Román P, Pantoja A. El manejo del suelo en la producción de hortalizas con buenas prácticas agrícolas. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013.
62. Chen S, Qi G, Ma G, Zhao X. Biochar amendment controlled bacterial wilt through changing soil chemical properties and microbial community. *Microbiological Research*.

2020;231. doi:10.1016/j.micres.2019.126373

63. Borno ML, Müller-Stöver DS, Liu F. Contrasting effects of biochar on phosphorus dynamics and bioavailability in different soil types. *Science of the Total Environment*. 2018;627: 963–974. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.01.283
64. Bernier V R, Bortolameolli S G. Nutrición de Cultivos. Seminario Taller Para Productores “Técnicas de Diagnostico de Fertilidad del Suelo, Fertilizacion de Praderas, Cultivos y Mejoramiento de Praderas.” 2000.
65. Marín Sánchez J, Mejía Contreras JA, Hernández Livera A, Carballo Carballo A, Peña Lomelí A. Acondicionamiento osmotico de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.). *Agricultura Técnica en México*. 2007;33: 63–71.
66. Pulido LE, Cabrera A, Medina N. Biofertilization using rhizobacteria and AMF in the production of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and onion (*Allium cepa* L.) Seedlings. II. Root colonization and nutritional status. *Cultivos Tropicales*. 2003;24: 5–13.
67. Rodriguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 1999;17: 319–339. doi:10.1016/S0734-9750(99)00014-2
68. Yazdani M, Bahmanyar MA, Pirdashti H, Ali M. Effect of Phosphate Solubilization Microorganisms (PSM) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Yield and Yield Components of Corn (*Zea mays* L.). *Scientia Agriculturae*. 2009;3: 50–52. doi:10.15192/pscp.sa.2017.18.3.6669
69. Valetti L, Iriarte L, Fabra A. Growth promotion of rapeseed (*Brassica napus*) associated with the inoculation of phosphate solubilizing bacteria. *Applied Soil Ecology*. 2018;132: 1–10. doi:10.1016/j.apsoil.2018.08.017
70. Sridevi S, Ramakrishnan K. Effects of combined inoculation of AM fungi and Azospirillum on the growth and yield of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of phytology*. 2010;2: 88–90.
71. Zhao Y, Hu M, Gao Z, Chen X, Huang D. Biological mechanisms of a novel hydro-electro hybrid priming recovers potential vigor of onion seeds. *Environmental and Experimental Botany*. 2018;150: 260–271. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.04.002
72. Abdel-Gaward AS, Ramadan BR, A Oraby RE. Legume phytases: Characteristics and changes in activity during germination. *International Journal of Agricultural Policy and Research*. 2013;1: 93–102.
73. Rodríguez-Blanco L, Lucas-Florentino B, Miranda-Cruz E, Guerrero-Olazarán M. Contenido de Ácido Fítico y Fósforo Inorgánico en *Vigna unguiculata* y *Phaseolus vulgaris* Germinadas a Diferentes Temperaturas. *Informacion Tecnologica*. 2018;29: 39–46. doi:10.4067/S0718-07642018000300039
74. Yoldas F, Ceylan S, Mordogan N, Esetlili BC. Effect of organic and inorganic fertilizers

- on yield and mineral content of onion (*Allium cepa* L.). *African Journal of Biotechnology*. 2011;10: 11488–11492. doi:10.5897/AJB10.2535
75. López-Dávila E, Gil Unday Z, Henderson D, Calero Hurtado A, Jiménez Hernández J, Spíritus Cuba S. Uso de efluente de planta de biogas y microorganismos eficientes como biofertilizantes en plantas de cebolla (*Allium cepa* L. , cv. “Caribe-71”). *Cultivos tropicales*. 2017;38: 7–14.
 76. Batool S, Iqbal A. Phosphate solubilizing rhizobacteria as alternative of chemical fertilizer for growth and yield of *Triticum aestivum* (Var. Galaxy 2013). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019;26: 1400–1410. doi:10.1016/j.sjbs.2018.05.024
 77. Karlicic V, Radic D, Jovicic-Petrovic J, Lalevic B, Jovanovic L, Kikovic D, et al. Isolation and characterization of bacteria and yeasts from contaminated soil. *Journal of Agricultural Sciences*. 2016;61: 247–256. doi:10.2298/jas1603247k
 78. Ahmad E, Zaidi A, Khan S. Response of PSM Inoculation to Certain Legumes and Cereal Crops. Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphos Technology. Uttar Pradesh, India: Springer International Publishing Switzerland 2014. pp. 175–205. doi:10.1007/978-3-319-08216-5
 79. Damse D, Bhalekar M, Pawar P. Effect of integrated nutrient management on growth and yield of garlic. *The Bioscan*. 2014;9: 1557–1560.
 80. Bakhshandeh E, Rahimian H, Pirdashti H, Nematzadeh GA. Evaluation of phosphate-solubilizing bacteria on the growth and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in northern Iran. *Journal of Applied Microbiology*. 2015;119: 1371–1382. doi:10.1111/jam.12938
 81. Cherchali A, Boukhelata N, Kaci Y, Abrous-Belbachir O, Djebbar R. Isolation and identification of a phosphate-solubilizing *Paenibacillus polymyxa* strain GOL 0202 from durum wheat (*Triticum durum* Desf.) rhizosphere and its effect on some seedlings morphophysiological parameters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;19. doi:10.1016/j.bcab.2019.101087
 82. Anzuay MS, Ciancio GR, Ludueña LM, Ludueña L, Angelini JG, Barros G, et al. Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. *Microbiological Research*. 2017;199: 98–109. doi:10.1016/j.micres.2017.03.006
 83. Tekeste N, Dechassa N, Woldetsadik K, Dessalegne L, Takele A. Influence of Nitrogen and Phosphorus Application on Bulb Yield and Yield Components of Onion (*Allium Cepa* L.). *Bentham open*. 2018;12: 194–206. doi:10.2174/1874331501812010194
 84. Lee J, Song J, Lee S. Excessive Fertilization is Detrimental to Yield and Quality for Onion Grown on High Organic Matter Content Paddy Soils. *International Journal of Vegetable Science*. 2012;18: 235–244. doi:10.1080/19315260.2011.623147
 85. Ludueña LM, Anzuay MS, Magallanes-Noguera C, Tonelli ML, Ibañez FJ, Angelini JG,

- et al. Effects of P limitation and molecules from peanut root exudates on pqqE gene expression and pqq promoter activity in the phosphate-solubilizing strain *Serratia* sp. S119. *Research in Microbiology*. 2017; 1–12. doi:10.1016/j.resmic.2017.07.001
86. Jha A, Saxena J, Sharma V. Investigation on Phosphate Solubilization Potential of Agricultural Soil Bacteria as Affected by Different Phosphorus Sources, Temperature, Salt, and pH. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2013;44: 2443–2458. doi:10.1080/00103624.2013.803557
 87. Oteino N, Lally RD, Kiwanuka S, Lloyd A, Ryan D, Germaine KJ, et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6: 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.00745
 88. Suleman M, Yasmin SI, Rasul M, Yahya M, Manzoor Atta B, Sajjad Mirza M. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *Plos One*. 2018;13. doi:10.1371/journal.pone.0204408
 89. Zambrano-Moreno DC, Ramón-Rodríguez LF, Strahlen-Pérez M Van, Bonilla-Buitrago RR. Bioinoculants industry for agricultural use in Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 2015;18: 59–67.
 90. Maghraoui T, Bechtaoui N, Galiana A, Wahbi S, Duponnois R, Hafidi M, et al. Effect of inoculation by Moroccan rock phosphate-solubilizing rhizobia, Versus phosphorus fertilization, on the growth and the phosphorus uptake by *Vicia faba*. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 2016;53: 817–826. doi:10.21162/PAKJAS/16.3461
 91. Serna Posso EJ, Sánchez De Prager M, Cisneros Rojas CA. Organic acids production by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. *Acta Agronomica*. 2017;66: 241–247. doi:10.15446/acag.v66n2.56148
 92. Babu AG, Shea PJ, Sudhakar D, Jung IB, Oh BT. Potential use of *Pseudomonas koreensis* AGB-1 in association with *Miscanthus sinensis* to remediate heavy metal(loid)-contaminated mining site soil. *Journal of Environmental Management*. 2015;151: 160–166. doi:10.1016/j.jenvman.2014.12.045
 93. Paul D, Sankar NS. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science*. 2017;15: 130–136. doi:10.1016/j.aasci.2016.10.001
 94. Gómez MI, Castro HE, Gómez CJ, Gutiérrez OF. Optimización de la producción y calidad en cebolla cabezona (*Allium cepa*) mediante el balance nutricional con magnesio y micronutrientes (B, Zn y Mn), Valle Alto del Río Chicamocha, Boyacá. *Agronomía Colombiana*. 2007;25: 339–348.
 95. Araujo J, Díaz-Alcántara CA, Urbano B, González-Andrés F. Inoculation with native Bradyrhizobium strains formulated with biochar as carrier improves the performance of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *European Journal of Agronomy*. 2020;113: 125985. doi:10.1016/j.eja.2019.125985

96. Berger B, Patz S, Ruppel S, Dietel K, Faetke S, Junge H, et al. Successful Formulation and Application of Plant Growth-Promoting *Kosakonia radicincitans* in Maize Cultivation. *BioMed Research International*. 2018;2018: 1–8. doi:10.1155/2018/6439481
97. Zaheer A, Mirza BS, Mclean JE, Yasmin S, Shah TM, Malik KA, et al. Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. *Research in Microbiology*. 2016;167: 510–520. doi:10.1016/j.resmic.2016.04.001
98. Sun D, Hale L, Crowley D. Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier. *Biology and Fertility of Soils*. 2016;52: 515–522. doi:10.1007/s00374-016-1093-9
99. Cha JS, Park SH, Jung SC, Ryu C, Jeon JK, Shin MC, et al. Production and utilization of biochar: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2016;40: 1–15. doi:10.1016/j.jiec.2016.06.002
100. Egamberdieva D, Wirth S, Behrendt U, Abd-Allah EF, Berg G. Biochar treatment resulted in a combined effect on soybean growth promotion and a shift in plant growth promoting rhizobacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00209
101. Seif Sahandi M, Mehrafarin A, Naghdi Badi H, Khalighi-Sigaroodi F, Sharifi M. Improving growth, phytochemical, and antioxidant characteristics of peppermint by phosphate-solubilizing bacteria along with reducing phosphorus fertilizer use. *Industrial Crops and Products*. 2019;141: 111777. doi:10.1016/j.indcrop.2019.111777
102. Balemi T, Pal N, Saxena AK. Response of onion (*Allium cepa* L.) to combined application of biological and chemical nitrogenous fertilizers. *Acta agriculturae Slovenica*. 2007;89: 107–114. doi:10.2478/v10014-007-0013-y
103. Seran TH, Srikrishnah S, Ahamed MMZ. Effect of Different Levels of Inorganic Fertilizers and ompost as basal application on the growth and yield of onion (*Allium cepa* L.). *The Journal of Agricultural Sciences*. 2010;5: 64–70.
104. Prendergast Miller MT, Duvall M, Sohi SP. Biochar-root interactions are mediated by biochar nutrient content and impacts on soil nutrient availability. *European Journal of Soil Science*. 2014;65: 173–185. doi:10.1111/ejss.12079
105. Nigussie A, Kissi E, Misganaw M, Ambaw G. Effect of Biochar Application on Soil Properties and Nutrient Uptake of Lettuces (*Lactuca sativa*) Grown in Chromium Polluted Soils. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. 2012;12: 369–376.
106. Hardie MA, Oliver G, Clothier BE, Bound SA, Green SA, Close DC. Effect of Biochar on Nutrient Leaching in a Young Apple Orchard. *Journal of Environmental Quality*. 2015;44: 1273–1282. doi:10.2134/jeq2015.02.0068
107. Rehman RA, Rizwan M, Qayyum MF, Ali S, Zia-ur-Rehman M, Zafar-ul-Hye M, et al. Efficiency of various sewage sludges and their biochars in improving selected soil properties and growth of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Environmental Management*. 2018;223: 607–613. doi:10.1016/j.jenvman.2018.06.081

5.8. Anexos

5.8.1. Saturación de magnesio, potasio y calcio acumulados en bulbo de cebolla

A continuación, se presenta una tabla con los valores de saturación de Mg^{2+} , K^+ y Ca^{2+} acumulados en los bulbos de las cebollas, al finalizar la evaluación del biofertilizante en materas.

Tabla 5.13. Saturación de magnesio (Mg), potasio (K) y calcio (Ca) acumulados en bulbo de cebolla.

Descripción del tratamiento	Saturación Mg (%) ^{ns}	Saturación K (%) ^{ns}	Saturación Ca (%) ^{ns}
Abundagro® + 5% Biochar + BPS	5,63 ± 0,16	39,80 ± 1,26	50,23 ± 4,56
Abundagro® + 2% Biochar + BPS	5,66 ± 0,15	39,29 ± 1,06	55,05 ± 1,12
Abundagro® + 5% Biochar solo	5,82 ± 0,30	37,94 ± 0,56	56,25 ± 0,82
Abundagro® + 2% Biochar solo	6,57 ± 0,94	38,90 ± 1,12	54,54 ± 1,22
Abundagro®	5,84 ± 0,25	38,26 ± 0,29	55,91 ± 0,54
Agua	6,04 ± 0,50	39,30 ± 1,04	54,64 ± 0,72
CV (%)	12,04	4,4	6,5

ns = no hay diferencias significativas F ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variación

5.8.2. Concentración de nutrientes y pH del suelo después de 4 meses de cultivo en materas

A continuación, se presenta una tabla con los valores originales de la caracterización nutricional completa del suelo de los diferentes tratamientos, obtenida al finalizar la evaluación del biofertilizante en materas.

Tabla 5.14. Características nutricionales y pH del suelo después del cultivo de *A. cepa* L., en materas (concentraciones finales).

Descripción del tratamiento	pH	CE	Densidad g cc ⁻¹ ns	CO (%) ns	MO (%) ns
Abundagro® + 5% Biochar + BPS	7,69 ± 0,04	0,69 ± 0,06	0,87 ± 0,02	6,96 ± 0,33	12,0 ± 0,57
Abundagro® + 2% Biochar + BPS	7,23 ± 1,25	0,77 ± 0,16	0,87 ± 0,08	6,60 ± 1,03	11,4 ± 1,77
Abundagro® + 5% Biochar sólo	7,70 ± 0,05	0,65 ± 0,07	0,84 ± 0,09	7,64 ± 2,24	13,1 ± 3,95
Abundagro® + 2% Biochar sólo	7,69 ± 0,04	0,74 ± 0,113	0,86 ± 0,05	6,86 ± 0,95	11,8 ± 1,66
Abundagro®	7,76 ± 0,035	0,67 ± 0,08	0,87 ± 0,03	6,64 ± 0,55	11,5 ± 0,92
Agua	7,58 ± 0,41	0,82 ± 0,08	0,88 ± 0,04	6,58 ± 0,46	11,2 ± 0,56
CV (%)	2,57	8,90	1,69	5,87	5,64
Descripción del tratamiento	N (%) ns	K (mg Kg ⁻¹) ns	Na (mg Kg ⁻¹)	Ca (mg Kg ⁻¹)	Mg (mg Kg ⁻¹)
Abundagro® + 5% Biochar + BPS	0,58 ± 0,03	538,3 ± 33,7	182,7 ± 13,8	5286,7 ± 228,6	127,2 ± 4,3
Abundagro® + 2% Biochar + BPS	0,55 ± 0,09	510,0 ± 49,8	190,7 ± 16,2	5240,0 ± 216,8	129,5 ± 9,1
Abundagro® + 5% Biochar sólo	0,63 ± 0,189	548,3 ± 51,1	175,0 ± 7,9	5331,7 ± 215,5	120,8 ± 3,1
Abundagro® + 2% Biochar sólo	0,57 ± 0,08	495,0 ± 53,2	181,3 ± 25,4	5216,7 ± 281,8	123,5 ± 3,7
Abundagro®	0,55 ± 0,05	523,3 ± 48,0	162,0 ± 10,9	5438,3 ± 253,3	120,7 ± 3,3
Agua	0,55 ± 0,04	498,3 ± 59,1	176,3 ± 14,4	5345,0 ± 241,6	117,5 ± 5,8
CV (%)	5,59	4,17	5,40	1,51	3,63
Descripción del tratamiento	Fe (mg Kg ⁻¹)	B (mg Kg ⁻¹)	P tot (mg Kg ⁻¹)	P ext (mg Kg ⁻¹)	P sol (mg Kg ⁻¹)
Abundagro® + 5% Biochar + BPS	0,200 ± 0,15	1,63 ± 0,06	1464,5 ± 127,3	101,2 ± 12,1	6,43 ± 0,45
Abundagro® + 2% Biochar + BPS	0,177 ± 0,11	1,65 ± 0,07	1523,1 ± 125,8	93,4 ± 8,0	6,59 ± 0,91
Abundagro® + 5% Biochar sólo	0,123 ± 0,023	1,62 ± 0,06	1469 ± 179,4	88,0 ± 5,8	7,31 ± 1,10
Abundagro® + 2% Biochar sólo	0,1 ± 0,017	1,61 ± 0,06	1445,9 ± 167,3	88,6 ± 7,0	6,20 ± 0,60
Abundagro®	0,2 ± 0,165	1,63 ± 0,06	1333,2 ± 157,5	101,1 ± 10,7	7,55 ± 0,76
Agua	0,140 ± 0,017	1,72 ± 0,03	1387,7 ± 255,2	93,1 ± 10,6	7,00 ± 0,72
CV (%)	24,68	2,51	4,67	6,16	7,70
Descripción del tratamiento	Mn (mg Kg ⁻¹)	Cu (mg Kg ⁻¹)	Zn (mg Kg ⁻¹)	S (mg Kg ⁻¹)	CIC
Abundagro® + 5% Biochar + BPS	61,2 ± 3,9	0,19 ± 0,06	9,46 ± 1,27	65,3 ± 12,2	29,6 ± 1,14
Abundagro® + 2% Biochar + BPS	64,7 ± 5,2	0,20 ± 0,09	10,31 ± 0,60	85,1 ± 15,1	29,4 ± 1,03
Abundagro® + 5% Biochar sólo	58,2 ± 3,3	0,17 ± 0,05	9,90 ± 0,71	57,0 ± 8,3	29,8 ± 1,02
Abundagro® + 2% Biochar sólo	55,3 ± 4,2	0,14 ± 0,05	9,22 ± 0,47	69,4 ± 17,1	29,1 ± 1,46
Abundagro®	58,7 ± 4,6	0,25 ± 0,06	9,53 ± 1,32	58,3 ± 14,9	30,2 ± 1,39
Agua	63,0 ± 10,5	0,15 ± 0,09	9,8 ± 0,71	79,3 ± 19,6	29,7 ± 1,08
CV (%)	5,75	22,58	3,93	16,34	1,26
Descripción del tratamiento	SatHum	Ca/Mg	Ca/K ns	Mg/K	Ca/Mg/K ns
Abundagro® + 5% Biochar + BPS	30,0 ± 1,3	25,3 ± 1,6	19,2 ± 1,4	0,79 ± 0,11	20,0 ± 1,4
Abundagro® + 2% Biochar + BPS	29,7 ± 1,4	24,7 ± 1,6	20,3 ± 2,7	0,82 ± 0,09	21,1 ± 2,7
Abundagro® + 5% Biochar sólo	29,3 ± 1,2	26,8 ± 1,6	19,1 ± 2,1	0,67 ± 0,11	19,9 ± 2,2
Abundagro® + 2% Biochar sólo	29,8 ± 1,1	25,6 ± 1,3	20,7 ± 2,4	0,81 ± 0,10	21,5 ± 2,5
Abundagro®	29,2 ± 0,3	23,7 ± 0,9	20,4 ± 1,6	0,75 ± 0,06	21,1 ± 1,6
Agua	29,3 ± 0,9	27,7 ± 1,9	21,2 ± 3,1	0,77 ± 0,09	22,0 ± 3,3
CV (%)	1,07	4,62	4,01	7,36	4,02

Tabla 5.14. Continuación. Características nutricionales y pH del suelo después del cultivo de *A. cepa* L en materas (concentraciones finales).

Descripción del tratamiento	SatMg	SatNa	SatK ^{ns}	SatCa ^{ns}
Abundagro [®] + 5% Biochar + BPS	3,54 ± 0,22	2,69 ± 0,19	4,66 ± 0,32	89,2 ± 0,40
Abundagro [®] + 2% Biochar + BPS	3,63 ± 0,22	2,83 ± 0,28	4,45 ± 0,55	89,1 ± 0,85
Abundagro [®] + 5% Biochar sólo	3,34 ± 0,17	2,56 ± 0,14	4,73 ± 0,53	89,4 ± 0,69
Abundagro [®] + 2% Biochar sólo	3,50 ± 0,16	2,71 ± 0,34	4,36 ± 0,46	89,5 ± 0,28
Abundagro [®]	3,29 ± 0,10	2,34 ± 0,13	4,43 ± 0,32	89,9 ± 0,29
Agua	3,26 ± 0,20	2,59 ± 0,23	4,31 ± 0,61	89,8 ± 0,88
CV (%)	4,33	6,39	3,66	0,37

Tukey ($p < 0,05$). ns = no significativo según prueba F ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variación