

INOCULACIÓN DE COMPOST CON MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO Y SU EFECTO SOBRE LA DISPONIBILIDAD DEL FÓSFORO

Anahís Isabel Velasco Salas

Julio, 2021



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Grado en Biotecnología
TRABAJO FIN DE GRADO
Curso académico: 2020-2021

**INOCULACIÓN DE COMPOST CON
MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES
DE FOSFATO Y SU EFECTO SOBRE LA
DISPONIBILIDAD DEL FÓSFORO**

Autora: Anahis Isabel Velasco Salas
Directora: Francisca Suárez Estrella
Codirectora: María José Estrella González
Departamento de Biología y Geología
Área de Microbiología

Agradecimientos

La vida me ha dado el regalo de toparme con personas maravillosas y una de las grandes dichas es que esas personas sean parte de mi crecimiento profesional. La primera persona a quien agradecer es mi querido profesor Joaquín Moreno, gracias infinitas por darme la oportunidad de entrar en su grupo de investigación, formado de profesionales con un corazón y valores maravillosos que me hicieron sentir parte del equipo y apoyada desde el primer día. Es maravilloso como en cada uno de ellos pude percibir la esencia de usted en su mirada, corazones y profesionalidad. Agradecer a María José López por aceptarme, siempre motivarme con una sonrisa, y llevar tan bien el orden del laboratorio en medio de la tormenta.

Muchas gracias a todos los integrantes del laboratorio por toda su ayuda y consejos, he aprendido muchísimo de ustedes y los llevaré siempre en mi corazón. En especial a mis dos estrellas, María José y Paqui, son dos mujeres admirables y no solo por su profesionalidad, sino también por su humanidad, por estar siempre allí para ayudar a los demás, apoyar y animar a todos. Personalmente han sido una luz en el túnel para mí; sin vuestro apoyo en este último año nada de esto hubiera sido posible. Gracias por vuestra paciencia, por hacerme un hueco en sus libretas, aunque la semana fuera un caos, por siempre su buen humor, por guiarme y por los consejos. ¡Las admiro y quiero muchísimo!

Gracias a mi compañero de piso por acompañarme todos estos años, no dejarme morir y ser el apoyo de uno para el otro desde que vivo en Almería. A las amistades en la carrera que siempre me sacaban una sonrisa e intentaban alejarme de mi nube gris. Obviamente a mi novio por apoyarme, estar siempre conmigo y escucharme, a pesar de la distancia física.

Por supuesto, a quienes me han dado la oportunidad de salir de la dictadura y mejorar mi calidad de vida va dedicado mi trabajo fin de grado. A Quique y mi madre, Zoraida, gracias por todo su apoyo incondicional.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Calidad y fertilidad del suelo: problemática de los suelos estériles y agotados	8
1.1.1. Importancia del fósforo en el crecimiento vegetal	8
1.1.2. Dinámica del fósforo en la relación suelo-planta	10
1.1.3. Mecanismos de solubilización de fosfatos	11
1.2. El compost como una alternativa sostenible para el enriquecimiento de suelos agotados.	13
1.2.1. Fases del compostaje	13
1.2.2. Microorganismos del compost, promotores del crecimiento vegetal (PGPMs)	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo general	15
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIALES Y METODOS	16
3.1. Muestras de compost	16
3.2. Colección de microorganismos	16
3.3. Medios de cultivo	17
3.4. Diseño experimental	19
3.5. Selección de microorganismos solubilizadores de fosfato	21
3.6. Preparación de muestras, inoculación, incubación, muestreo y conservación	21
3.6.1. Preparación de los inóculos microbianos	21
3.6.2. Inoculación de las muestras de compost e incubación	21
3.6.3. Toma de muestras y conservación	22
3.7. Análisis de las distintas fracciones de fósforo	22
3.7.1. Determinación del Fósforo total (PT)	24
3.7.2. Determinación de Fósforo inorgánico (PI) y Fósforo orgánico (PO)	24
3.7.3. Fósforo inorgánico no apatito (NAIP)	24
3.8. Determinación de fósforo	24
3.9. Determinación del pH del sustrato	25
3.10. Análisis de datos	25
4. Resultados	26
4.1 Selección de microorganismos solubilizadores de fosfato	26
4.2 Análisis de las distintas fracciones de fósforo	27
4.2.1. Análisis descriptivo	27
4.2.2. Estudio de la variable pH en el sustrato	31

4.2.3. Análisis de correlación en función de la cepa seleccionada.....	32
4.2.4. Interacciones entre cepas en las diferentes fracciones de fosfato	33
5.CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFIA	39

RESUMEN

El uso de fertilizantes químicos para la agricultura está erosionando los suelos y contaminando los lagos, por lo cual, la búsqueda de una fertilización más ecológica se ha vuelto uno de los principales objetivos de este siglo. El fósforo es uno de los nutrientes fundamentales para el crecimiento vegetal, este elemento en el suelo no se encuentra directamente biodisponible para las plantas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la bioaumentación con microorganismos solubilizadores de fósforo sobre las principales fracciones de este elemento en compost maduro, como estrategia para enriquecer los suelos agrícolas. Para ello, se seleccionaron tres cepas: dos bacterias del género *Bacillus* (1374 y 2310) y un hongo del género *Penicillium* (4217) con capacidad para solubilizar fosfatos. En el diseño experimental planteado, se muestreó a tiempo inicial, tiempo final (40 días) y en un punto intermedio (20 días), para conocer mejor la evolución del proceso. Debido a la termotolerancia presentada por los tres microorganismos, se seleccionaron dos temperaturas de incubación (30 y 40 °C). El método escogido para la determinación de las diferentes fracciones de fósforo fue el propuesto por la Comisión Europea: *Standards, Measurements and Testing* (SMT). Con este método las fracciones determinadas fueron: fósforo total (PT), fósforo orgánico (PO), fósforo inorgánico (PI) y fósforo inorgánico no apatito (NAIP). A partir de los sustratos inoculados con los diferentes microorganismos se obtuvieron interesantes resultados. En los sustratos inoculados con la cepa *Bacillus* 1374 se vio un ligero descenso de la fracción de fósforo total y no apatito, a temperaturas de incubación de 40 °C, mientras que la inoculación con *Bacillus* 2310 y *Penicillium* 4217, dio lugar al incremento de la fracción de NAIP a esa misma temperatura. Estos resultados son favorables ya que, posicionan la estrategia de inoculación con agentes solubilizadores de fósforo como una técnica útil para incrementar la fitodisponibilidad de este elemento en suelos y enmiendas orgánicas como el compost

Palabras clave: *Bacillus*, bioaumentación, compost, fraccionamiento de fósforo y *Penicillium*.

ABSTRACT

The use of chemical fertilizers for agriculture is eroding soils and polluting lakes, so the search for more environmentally friendly fertilization has become one of the main objectives of this century. Phosphorus is one of the fundamental nutrients for plant growth, but this element in the soil is not directly bioavailable to plants. The objective of the present work was to evaluate the effect of bioaugmentation with phosphorus solubilizing microorganisms on the main fractions of this element in mature compost, as a strategy for the enrichment of agricultural soils. For this purpose, three strains were selected: two bacteria of the genus *Bacillus* (1374 and 2310) and a fungus of the genus *Penicillium* (4217) with the capacity to solubilize phosphates. In the experimental design, samples were taken at T0, T20 and T40 days, to better understand the evolution of the process. Due to the thermotolerance of the three microorganisms, two incubation temperatures (30 and 40 °C) were selected. The method chosen for the determination of the different phosphorus fractions was the one proposed by the European Commission: Standards, Measurements and Testing (SMT). With this method, the fractions determined were: total phosphorus (TP), organic phosphorus (OP), inorganic phosphorus (IP) and non-apatitic inorganic phosphorus (NAIP). Interesting results were obtained in the substrates inoculated with the different microorganisms. In the substrates inoculated with *Bacillus* strain 1374, a slight decrease in the fraction of total and non-apatite phosphorus (NAIP) was observed at incubation temperatures of 40 °C, while inoculation with *Bacillus* 2310 and *Penicillium* 4217 produced an increase in the NAIP fraction at the same temperature. These results are favorable as they position the inoculation strategy with phosphorus solubilizing agents as a useful technique to increase the phytoavailability of this element in soils and organic amendments such as compost.

Keywords: *Bacillus*, bioaugmentation, *Penicillium*, compost and phosphorus fractions

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Calidad y fertilidad del suelo: problemática de los suelos estériles y agotados

La erosión y agotamiento de los suelos es un problema de orden mundial que afecta al medio ambiente y a la producción agrícola. Cada año se pierden, aproximadamente, 10 millones de hectáreas de tierra de cultivo debido a este problema, lo que según la Organización Mundial de la Salud, supone un agravamiento continuado de los problemas derivados de la falta de disponibilidad de alimentos y desnutrición a nivel mundial (Pimentel, 2006).

El suelo constituye la parte superficial de la corteza terrestre. La formación del suelo depende de la desintegración física y de la alteración química de las rocas así como de la transformación de los residuos orgánicos procedentes de los seres vivos. Además, el suelo es utilizado por las plantas como soporte físico y para la obtención de nutrientes (Havlin *et al.*, 2005).

El proceso de esterilización o agotamiento de un suelo se caracteriza por una reducción o pérdida de la cubierta vegetal y de su productividad y biodiversidad debido a factores físico-químicos que pueden ser consecuencia del cambio climático, de la actividad antropogénica o de otros procesos naturales (Symeonakis *et al.*, 2016). Los cambios más significativos que se pueden observar como consecuencia de la erosión y agotamiento de los suelos son:

- Menor porosidad.
- Disminución de la capacidad de retención de agua.
- Disminución de la velocidad de infiltración del agua.
- Disminución de la disponibilidad de micronutrientes como fósforo y nitrógeno.
- Reducción de la biodiversidad de la microbiota del suelo.

Los suelos erosionados se caracterizan por un pH bajo y por presentar deficiencias de nutrientes disponibles, principalmente N y P. En estos suelos, se reduce la productividad ecológica y se incrementa la escorrentía del agua, debido a que disminuye la capacidad de retención de esta. Como consecuencia, disminuye la producción vegetal y la biodiversidad microbiana del ecosistema del suelo, dando paso a la aparición de suelos estériles (Pimentel, 2006). Por este motivo, en los últimos años, muchos estudios se han centrado en los efectos de la fertilización a largo plazo, mediante el uso de fertilizantes orgánicos e inorgánicos capaces de mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo y aumentar el rendimiento de los cultivos (Torres y Millán, 2015).

1.1.1. Importancia del fósforo en el crecimiento vegetal

El fósforo (P) es un nutriente esencial para todos los seres vivos. De hecho, es uno de los diecinueve elementos considerados como imprescindibles para el crecimiento vegetal. Constituye un componente fundamental para los sistemas responsables del almacenamiento y transferencia de energía (ADP, ATP) y es esencial para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos. Además, es indispensable durante el proceso de fotosíntesis, en el transporte de nutrientes y en la síntesis de proteínas (Fernández *et al.*, 2005). A nivel agronómico, el fósforo estimula la germinación de las semillas, el desarrollo de las raíces, del tallo, y las flores, siendo fundamental para mejorar el

rendimiento y la calidad del cultivo (Malhotra *et al.*, 2018). De hecho, se estima que la deficiencia de fósforo en los suelos de cultivo ha provocado pérdidas de rendimiento de hasta el 40% en los últimos años (Malhotra *et al.*, 2018).

La deficiencia de fósforo durante el desarrollo vegetal puede provocar graves problemas a nivel fisiológico como son:

- Inhibición de la síntesis de RNA, lo que afecta directamente a la síntesis de proteínas.
- Acumulación en las plantas de aminoácidos, como arginina, glutamina, prolina, lisina, asparagina e iones de amonio.
- Se produce falta de equilibrio adecuado entre el contenido en azúcares y almidón.
- El metabolismo pasa de primario a secundario, ya que en este último se reciclan grandes cantidades de P provenientes de ésteres de fosfato, provocando un exceso de equivalentes reductores.
- Las plantas sufren alteraciones en la composición de la membrana de los tilacoides, los fosfolípidos son reemplazados por sulfolípidos para que el P pueda ser utilizado en la fotosíntesis.

También pueden aparecer anomalías físicas, sobre todo cuando la concentración de fósforo en las hojas es inferior al 0,2%:

- Coloración morada en los márgenes de las hojas debido a la formación de antocianinas, pigmentos de color morado. Este cambio de color se suele observar en el envés de las hojas inferiores, como se observa en la Figura 1 (Wissuwa, 2003).



Figura 1: Tono púrpura característico de la deficiencia de fósforo en hojas y tallos. Tomado de: INTAGRI (2017).

- Crecimiento lento causado por la menor tasa fotosintética (hojas más pequeñas y en menor número) y por ello, las plantas son de menor tamaño (Figura 2). Además, la maduración se ve retardada, se produce un bajo rendimiento y mala calidad del producto (Wissuwa, 2003).
- Reducción de masa radicular (Figura 2), lo cual afecta a la asimilación de nutrientes y de agua, así como a la mayor susceptibilidad de la planta a enfermedades (Wissuwa, 2003).



Figura 2. Diferencias en crecimiento radicular y tamaño foliar de plantas con deficiencia de fósforo y control. Tomado de: (<https://plantscience.psu.edu/research/labs/roots/methods/metodologia-de-investigacion/observando-los-desordenes-nutricionales-de-las-plantas/deficiencia-de-fosforo>)

- Enrollamiento de las hojas: cuando la deficiencia es severa, las hojas tienden a enrollarse hacia arriba. Senescencia prematura de las hojas en las últimas etapas del desarrollo (Wissuwa, 2003).

En algunos casos es probable que se produzca el efecto contrario, es decir, que haya exceso de fósforo producido principalmente por el abuso de fertilización química con nitrógeno, potasio y fósforo (NKP), lo cual interfiere en la absorción de otros elementos necesarios, como hierro, magnesio y zinc (Wissuwa, 2003).

1.1.2 Dinámica del fósforo en la relación suelo-planta

El fósforo en el suelo no se encuentra totalmente disponible para que las plantas lo usen como nutriente, sino que dicha disponibilidad depende del tipo de suelo y algunos parámetros físico-químicos como son el pH, la textura, la propia concentración de P y la presencia de algunos metales y aniones (Hinsinger, 2001).

En el suelo, el P se puede presentar bajo dos formas, fósforo orgánico (PO) y fósforo inorgánico (PI). Ambas formas coexisten en un complejo equilibrio, en el que están incluidos desde las fracciones de P más estables (poco disponibles) hasta las más inestables y disponibles para la planta, como el P lábil y el P en solución.

El fósforo inorgánico representa entre un 35 y un 70 % del fósforo total (Harrison, 1987). Este se puede encontrar de forma estable en minerales primarios como los apatitos y variscitas. Cabe destacar que, el aporte al suelo de fósforo disponible procedente de estos minerales es insuficiente y muy lento para poder cubrir la demanda de los cultivos (Albacete, 2014). En la Tabla 1 se observan los distintos tipos de fósforo inorgánico que se pueden encontrar en el suelo y sus características.

Tabla 1. Tipos de fósforo inorgánico que se pueden encontrar en los suelos. Modificado de Tsai y Rossetto (1992).

Tipo de fosfato	Denominación	Composición	Características
Fosfatos de calcio	Hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}(\text{OH})_2$	Poco soluble
	Oxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaO}$	Poco soluble
	Fluoroapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaFe}_2$	Poco soluble
	Carbonatoapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaCO}_3$	Poco soluble
	Fosfato tricálcico	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Menor solubilidad
	Fosfato dicálcico	CaHPO_4	Mayor solubilidad
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$	Mayor solubilidad
Fosfatos de hierro	Livianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Poco soluble
	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco soluble
Fosfato de aluminio	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco soluble

La velocidad de disolución de los fosfatos presentes en los minerales secundarios, como los fosfatos de calcio, hierro y aluminio puede variar debido al pH del suelo y al tamaño de la partícula. Entre los cambios dependientes de pH se encuentra el aumento de la insolubilidad de los fosfatos de aluminio y hierro al disminuir el pH, y un aumento de solubilidad al aumentar el pH. Sin embargo, la solubilidad de los fosfatos unidos a calcio disminuye con el incremento del pH (Hinsinger, 2001). Este fenómeno se debe a que las raíces absorben el fósforo principalmente en forma de iones ortofosfato primario (H_2PO_4^-) y secundario (HPO_4^{2-}).

En lo que respecta al fósforo orgánico, este se encuentra en el suelo en formas estables (fosfonatos e inositol fosfato) y en formas activas (monoésteres de ortofosfato lábiles, polifosfatos orgánicos y diésteres de ortofosfato). El proceso de transformación de fósforo orgánico en inorgánico es producido por los microorganismos del suelo que producen ácidos orgánicos que hacen que el pH del suelo baje y por consecuencia se acidifica, y estos nuevos iones de fosfatos quedan biodisponibles para las plantas (Albacete, 2014).

Para aumentar la absorción de P, los microorganismos producen ácidos orgánicos y fosfatasas extracelulares que acidifican la rizosfera, provocando un movimiento más fácil del P dentro del sistema radicular de las plantas (Hinsinger, 2001). Tras absorberse por la raíz, el fósforo es transportado hacia el xilema y luego a las partes aéreas de la planta. El transporte inter e intracelular de P desde el xilema al citoplasma y luego a la vacuola es un proceso dependiente de energía (Malhotra *et al.*, 2018).

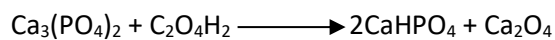
1.1.3 Mecanismos de solubilización de fosfatos

Debido a las diferentes formas en las cuales se encuentra el P en el suelo y a que no todas están biodisponibles para las plantas, la capacidad de determinados microorganismos de solubilizar el fosfato haciéndolo más disponible para la planta, resulta de especial interés. Entre los mecanismos de solubilización de fosfato que poseen los microorganismos se encuentra la producción de ácidos orgánicos (disminución del pH), producción de enzimas fosfatasas (mineralización) y la quelación del fósforo.

Producción de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos actúan sobre el fosforo apatito, que es un fosfato cálcico inorgánico en forma de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$ unido a (F, Cl OH) y lo hacen disponible para las plantas mediante acidificación del suelo. Al bajar el pH se forman complejos que quelan los iones metálicos de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} y Fe^{2+} asociados al fósforo insoluble y convirtiéndolos en biodisponibles para la planta (Ramírez et al., 2014).

Las bacterias, mediante la producción de ácidos orgánicos, pueden convertir $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en fosfato dibásico y monobásico, asimilables por las plantas. Una gran mayoría de bacterias producen estos ácidos orgánicos a través del metabolismo de la glucosa. La liberación de fósforo disponible al medio se llevaría a cabo a través de la siguiente reacción (Plazas et al., 2018):



Fosfato tricálcico + Acido oxálico Fosfato dicálcico+ oxalato de Ca

Mineralización mediante producción de enzimas fosfatasas

Los microorganismos favorecen el pasa desde PO a PI y con ello lo hacen más biodisponible para las plantas. Este proceso se lleva a cabo mediante la mineralización de ésteres de fosfato, debido a la acción de unas enzimas hidrolíticas llamadas fosfatasas (Tapia-Torres y García-Oliva, 2013). Las fosfatasas se dividen en ácidas (pH óptimo de 3,5 a 4,5), que son producidas por los hongos y las raíces de las plantas, y las alcalinas que son producidas por bacterias (pH óptimo de 9 a 11). Ambas aumentan la concentración disponible de fósforo inorgánico soluble para las plantas. La descomposición de la materia orgánica en el suelo se logra mediante la acción de las bacterias que liberan el ion ortofosfato desde las estructuras unidas al carbono, en este proceso las enzimas catalizan la ruptura hidrolítica del fósforo orgánico del enlace éster (C-O-P), dejando el fósforo inorgánico disponible para que pueda ser asimilado (H_2PO_4 y HPO_4^{2-}) (Ramírez et al., 2014). Los géneros de bacterias que se conocen como productores de fosfatasas son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea* y *Burkholderia* (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010).

Las fitasas, por su parte, son fosfatasas producidas por *Bacillus* sp, las cuales permiten la liberación del fósforo insoluble a partir de la hidrólisis de fitatos que se encuentran en el ácido fítico (hexafosfato de inositol). Otras fosfatasas son las nucleotidasas que hidrolizan nucleótidos, liberando una molécula de fosfato, y las azúcares fosfato fosfohidrolasas, que hidrolizan azúcares-fosfato para liberar fosfato (Bobadilla et al., 2008).

Quelación del fósforo

Un mecanismo indirecto de solubilización de fosfatos utilizado por algunos microorganismos es la quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes, mediante la asimilación directa de los fosfatos insolubles, acumulación en sus células y posterior liberación (Beltrán et al., 2014).

1.2. El compost como una alternativa sostenible para el enriquecimiento de suelos agotados

El uso excesivo de los fertilizantes químicos genera erosión del suelo, pérdida de biodiversidad, modificación de las propiedades del suelo, contaminación de aguas subterráneas mediante escorrentía y percolación de residuos químicos. Por este motivo, es muy importante buscar alternativas más “respetuosas” con el ecosistema que mejoren las características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo. Una alternativa sostenible es la aplicación de compost como enmienda orgánica a los suelos (Füleky y Benedek, 2010).

El compostaje es un proceso aeróbico de biotransformación de la materia orgánica mediante el cual se obtiene un producto final llamado compost. Durante este proceso, se suceden una serie de fases térmicas (Fase Mesófila, Fase Termófila, Fase de Enfriamiento, Fase de Maduración). A lo largo del proceso, los microorganismos producen una enorme diversidad de enzimas que les permiten utilizar los diferentes sustratos que se encuentran en el medio (Moreno y Moral, 2008).

En España las aplicaciones del compost están reguladas mediante el Real Decreto 999/2017. Entre las aplicaciones recomendadas del compost se encuentra el uso como abono natural en agricultura ecológica, o como material para restauración de suelos degradados y fertilizante. Para llevar a cabo el proceso de compostaje se pueden utilizar como materias primas una gran variedad de restos orgánicos de origen muy diverso, por lo que la práctica del compostaje se encuentra estrechamente relacionada con los conceptos de reciclaje, revalorización y fomento de una agricultura sostenible (Sánchez *et al.*, 2017).

1.2.1. Fases del compostaje

El proceso de compostaje se divide en dos fases principales características: fase bio-oxidativa, de mayor actividad microbiana y disponibilidad de nutrientes, y fase de maduración, en la que la disponibilidad de nutrientes fácilmente asimilables es menor y por ende la actividad microbiana desciende. Así mismo, durante el compostaje se distinguen 4 fases térmicas, en función de la temperatura alcanzada en el interior de la pila, estas son:

1. Fase mesófila: En esta fase es donde comienza la descomposición de la materia orgánica realizada por microorganismos mesófilos y termófilos que crecen entre 10 y 42 °C, como bacterias pertenecientes a las familias *Peudomonadaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptomyceataceae*. Estos microorganismos utilizan como materia prima, compuestos solubles y fácilmente asimilables como azúcares, aminoácidos y lípidos. Como consecuencia, se producen ácidos orgánicos que disminuyen el pH (Bernal *et al.*, 2009).

2. Fase termófila: En esta fase, debido a reacciones exotérmicas, se eleva la temperatura llegando a alcanzar los 45 y 70 °C, el pH aumenta tendiendo a ser alcalino y el nitrógeno se convierte en amoníaco. Los microorganismos que actúan mayormente en la fase termófila son actinobacterias que producen enzimas capaces de degradar moléculas más complejas como celulosa, lignina, hemicelulosa y proteínas. Durante esta fase se lleva a cabo

la higienización de la pila, evitando así que los microorganismos patógenos colonizen el compost (Sánchez *et al.*, 2017).

3. Fase de enfriamiento: Debido al agotamiento de las fuentes de energía, la temperatura baja en un rango de 15 a 35 °C y el pH desciende ligeramente. Durante esta fase hay una recolonización de bacterias y hongos mesófilos (Bernal *et al.*, 2009).

4. Fase de maduración: En esta última etapa, la temperatura alcanza valores similares a los del ambiente. Se producen reacciones que aumentan la humificación de la materia orgánica y el producto final es más estable. Los hongos son primordiales en esta etapa debido a que están implicados en el proceso de humificación de los materiales (Bernal *et al.*, 2009).

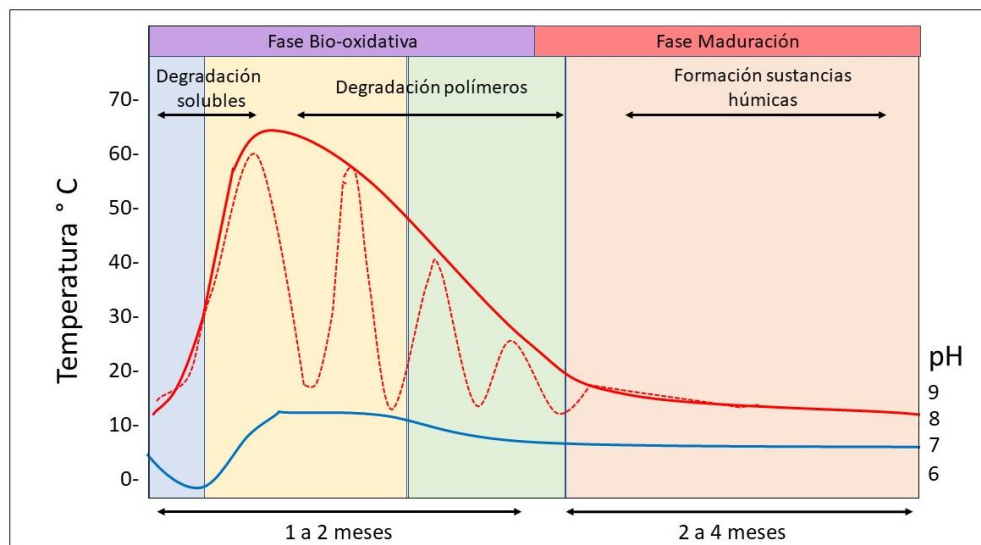


Figura 3. Fases del proceso de compostaje. Moreno y Mormeneo, 2008

1.2.2. Microorganismos del compost, promotores del crecimiento vegetal (PGPMs)

Los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPMs) desempeñan un papel importante en la rizosfera, utilizando una diversidad de mecanismos que pueden ser directos o indirectos. Entre los mecanismos directos se encuentra su intervención en la fijación de nitrógeno, absorción del agua, o la solubilización y transporte de minerales del suelo a la planta, como es el caso del zinc, fósforo y potasio. Otro de los mecanismos directos en los que actúan los PGPMs es que pueden sintetizar fitohormonas y compuestos orgánicos para mejorar el crecimiento vegetal. Por otra parte, algunos de los mecanismos indirectos más importantes son la estimulación de defensa contra agentes patógenos mediante producción de metabolitos antimicrobianos o bien la competencia por el espacio y los nutrientes (Soumare *et al.*, 2021). Un resumen del efecto producido por este grupo microbiano en plantas se indica en la Figura 4.

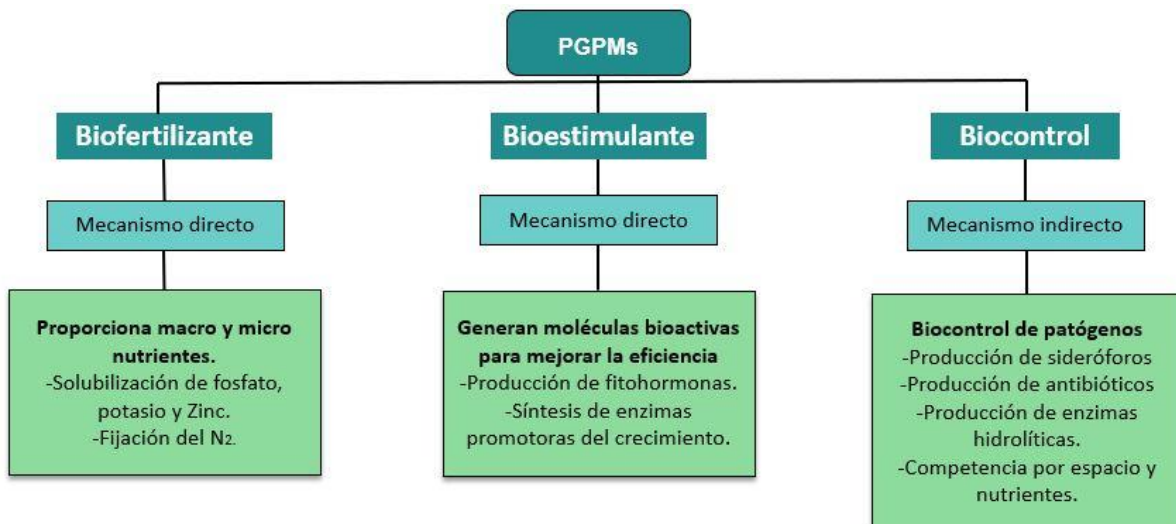


Figura 4. Mecanismos directos e indirectos de los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPMs). Modificado de Soumare *et al.* (2021).

En lo que respecta a grupos microbianos, existen dos grupos principales de PGPMs: hongos promotores del crecimiento de las plantas (PGPF) y bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB). Entre los géneros de PGPF más interesantes se encuentran *Trichoderma* spp, *Rhizophagus*, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp y *Aspergillus* spp. Los hongos endofíticos promueven el crecimiento de plantas al mejorar su absorción de fósforo, potasio y zinc y/o la producción de fitohormonas como citoquinas, ácido indol acético y ácido giberélico (Rana *et al.*, 2019). Los géneros más conocidos de PGPBs son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azobacter*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Serratia* y *Streptomyces*. Se ha comprobado que la inoculación con ciertos tipos de microorganismos en el suelo ofrece grandes ventajas a los cultivos vegetales, gracias, por ejemplo, a la síntesis de auxinas y citoquinas, o a la mayor solubilización de minerales esenciales (Verma *et al.*, 2019).

En conclusión, en la búsqueda de mejoras hacia una agricultura sostenible, en la que se reduzca el uso de agroquímicos, el uso de compost para la fertilización y mantenimiento de las características físico-químicas del suelo es fundamental. En este sentido, la importancia del fosfato en el desarrollo vegetal, sumado a la baja biodisponibilidad del fósforo en el suelo, hace que el estudio de los diferentes microorganismos que protagonizan el proceso de compostaje y de su aplicación al suelo como estrategia de bioaumentación, resulte hoy día de un enorme interés.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

En función de lo indicado anteriormente, el objetivo global de este Trabajo Fin de Grado fue evaluar el efecto de la bioaumentación con microorganismos solubilizadores de fósforo sobre el fraccionamiento y la biodisponibilidad de este elemento en muestras de compost.

2.2 Objetivos específicos

A partir del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinación del potencial de una colección de cepas de hongos y bacterias aisladas de compost para solubilizar fosfatos *in vitro*, y selección de los mejores candidatos para ser utilizados como inoculantes en un protocolo de bioaumentación.
- Aplicación del procedimiento *Standards, Measurements and Testing (SMT)* para el fraccionamiento y cuantificación de fracciones orgánicas e inorgánicas de fósforo, a partir de muestras de compost bioaumentadas con microorganismos solubilizadores de fosfatos.
- Selección de cepas microbianas capaces de incrementar la biodisponibilidad del fósforo a partir de compost.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Muestras de compost

El sustrato empleado en el presente proyecto corresponde a un compost maduro procedente de restos de plantas de tomate, tomate de destrío y paja de maíz (2:1:2), desarrollado previamente por el grupo BIO-175 en el seno del Proyecto Agrimax (H2020, 720719).

3.2. Colección de microorganismos

El cepario estaba constituido por 11 cepas previamente aisladas e identificadas por el grupo BIO-175. Todas las cepas procedieron de material vegetal compostado (maduración parcial o completa), habiendo sido caracterizadas en función de diversas habilidades metabólicas (López-González *et al.*, 2014), entre las que destacan la capacidad amilolítica, pectinolítica, lipasa, proteasa, xilanasas, celulasa, ligninasa o amonificante (Tabla 2).

Tabla 2. Caracterización enzimática de las cepas pertenecientes a la colección de estudio. Ami: Amilasa, Pec: Peptinasa, Lip: Lipasa, Pro: Proteasa, Xil: Xilanasas, Cel: Celulasa, Lac1: Lacasa 1, Lac2: Lacasa 2, , Amm: Amonificante.

Código	Nombre	Ami	Pec	Lip	Pro	Xil	Cel	Amm	Lac1	Lac2
1374	<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	0
2310	<i>Bacillus sp.</i>	1	1	0	1	1	0	1	1	0
2519	<i>Bacillus sp.</i>	0	1	0	1	1	0	1	1	0
2572	<i>Bacillus sp.</i>	0	1	0	1	1	0	1	1	0
3138	<i>Bacillus sp.</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	1
4217	<i>Penicillium sp.</i>	0	1	1	0	1	0	1	0	0
4288	<i>Yamadazyma sp.</i>	0	1	1	0	1	0	1	0	0
4289	<i>Yamadazyma sp.</i>	0	1	1	0	1	0	1	0	0
4312	<i>Rhodotorula sp.</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	0
4781	<i>Gibellulopsis sp.</i>	0	1	1	1	1	0	1	0	0
4783	<i>Penicillium sp.</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	0

3.3. Medios de cultivo

- APHA

Para preparar el medio de cultivo APHA se pesaron 23,5 g de APHA (Panreac) y se disolvieron en 1 litro de agua destilada. Finalmente, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min. Después de enfriarse el medio, éste se repartió en placas de Petri estériles a razón de, aproximadamente, 20 mL por placa. Los componentes del medio APHA se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes medio APHA.

Componente	Cantidad (g/L)
Extracto de levadura	2,5
Glucosa	1,0
Agar bacteriológico	15,0
Enzima digestiva Caseína	5,0
Agua destilada	1L

- Caldo Patata Dextrosa (PDB):

El medio PDB se empleó para el cultivo de hongos (Tabla 5). Para la preparación del medio de cultivo, se pesaron 26,5 g de PDB (Panreac) y se disolvió en 1 L de agua destilada. Posteriormente, se esterilizaron en tubos de centrifuga a razón de 5mL/tubo y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min. Los componentes del medio PDB se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Componentes medio PDB.

Componente	Cantidad (g/L)
Extracto de patata	6,5
Dextrosa	20,0
Agua destilada	1L

- Agar Patata Dextrosa (PDA)

En la Tabla 5, se describen los componentes del medio PDA, el cual se utilizó para el mantenimiento de hongos en sustrato sólido.

Tabla 5. Componentes del medio PDA.

Componente	Cantidad (g/L)
Extracto de patata	4,0
Dextrosa	20,0
Agar bacteriológico	15,0
Agua destilada	1L

Para la elaboración del medio PDA, se pesaron 39 g de PDA del preparado comercial (Panreac) y se disolvieron en 1 L de agua destilada. A continuación, se esterilizó a 121 °C durante 20 min. Después de enfriarse el medio, se repartió en placas de Petri estériles.

- Caldo Nutritivo (CN)

El caldo nutritivo (CN) se utilizó como medio de cultivo líquido para el crecimiento de bacterias. Para su preparación se suspendieron 8 g de medio deshidratado (Cultimed) en 1L de agua destilada y se repartieron en tubos a razón de 5 mL/tubo. Finalmente, el medio se autoclavó a 121 °C durante 20 min. Los componentes del medio CN se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes del caldo nutritivo.

Componente	Cantidad (g/L)
Peptona de gelatina	5
Extracto de carne	3
Agua destilada	1L

- Agar Pikovskaya (PKV)

El agar PKV, cuyos componentes se indican en la Tabla 7, se utiliza para comprobar la capacidad solubilizadora de fosfato de ciertos microorganismos. Para su preparación, se pesaron los componentes y se disolvieron en un 1 L de agua destilada. A continuación, el medio se esterilizó a 121 °C durante 20 min. Una vez alcanzó la temperatura de sobrefusión, el medio se repartió en placas de Petri estériles.

Tabla 7. Componentes del medio PKV.

Componente	Cantidad (g/L)
Glucosa	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
NaCl	0,2
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,1
KCl	0,2
Extracto de levadura	0,5
MnSO ₄ H ₂ O	0,002
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,002
Agar	15
Agua destilada	1L

3.4. Diseño experimental

El diseño experimental del presente trabajo se muestra en la Figura 5. En primer lugar, las cepas de colección se caracterizaron y seleccionaron en función de su capacidad para solubilizar fosfatos. Posteriormente, se prepararon cultivos de las cepas seleccionadas que fueron inoculadas en muestras de compost a una dosis previamente establecida. Las muestras inoculadas se incubaron durante 40 días, a una temperatura de 30 °C y 40 °C. Durante el tiempo de incubación se realizaron varios muestreos en los que se realizó el análisis de las diferentes fracciones de fósforo descritas en el protocolo SMT (Standards, Measurements and Testing). En paralelo, se utilizaron muestras de compost sin inocular a modo de control. Posteriormente se midió el pH de los sustratos mediante un pH-metro.

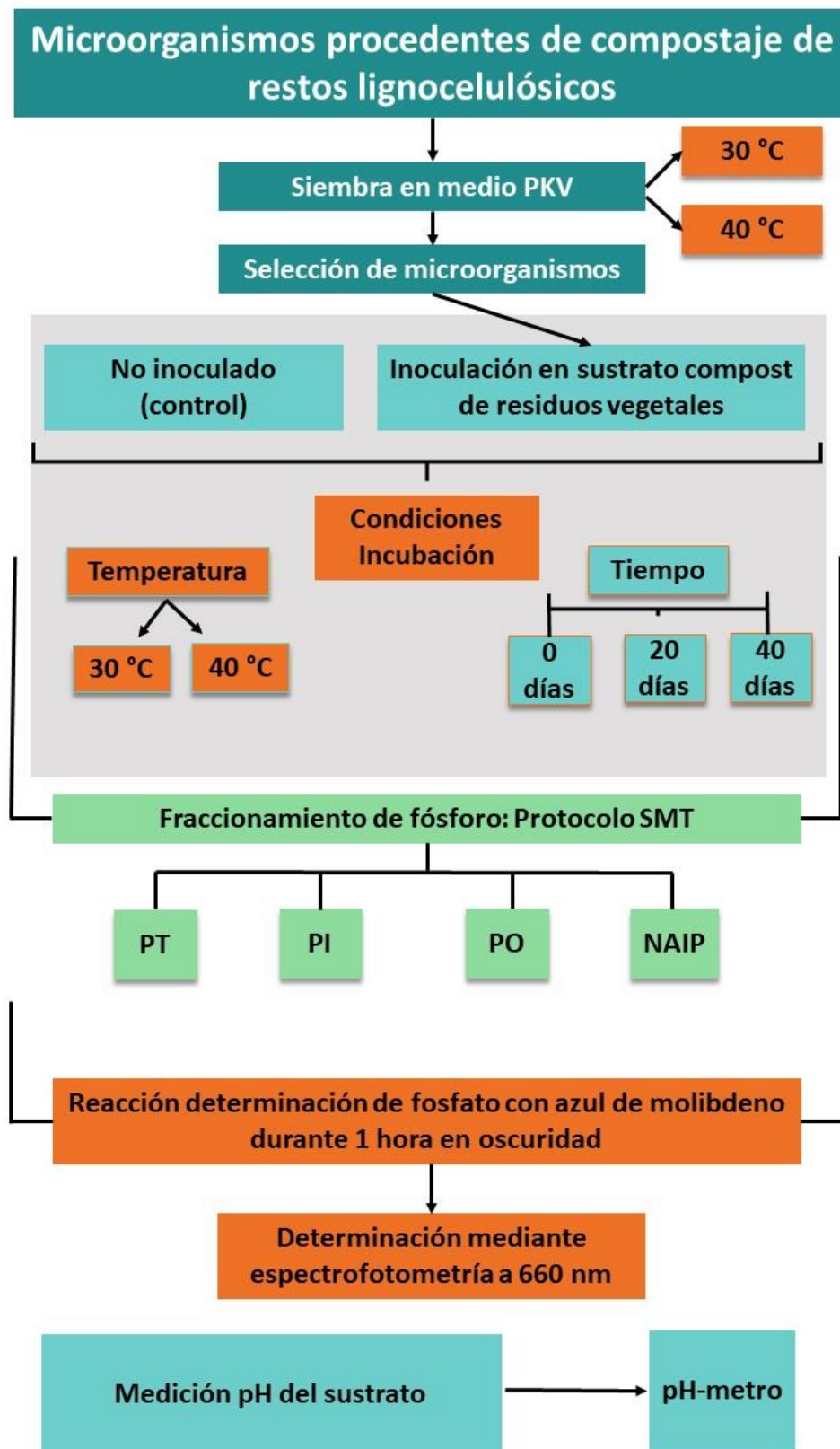


Figura 5. Diseño experimental. PT: Fósforo total, PO: Fósforo orgánico, PI: Fósforo inorgánico, NAIP: Fósforo no apatito.

3.5. Selección de microorganismos solubilizadores de fosfato

La capacidad de solubilización de fosfatos por parte de los microorganismos de la colección se evaluó mediante la siembra en medio agar Pikovskaya, en el que la aparición de halos de aclaramiento alrededor de las colonias microbianas es indicativo de que el microorganismo es capaz de solubilizar el fosfato (Pikovskaya, 1948). Aprovechando que los microorganismos estudiados son termotolerantes, la prueba se llevó a cabo bajo dos condiciones de temperatura diferente (30 °C y 40 °C). En cualquier caso, las placas se incubaron durante 48 horas en oscuridad.

3.6. Preparación de muestras, inoculación, incubación, muestreo y conservación

3.6.1. Preparación de los inóculos microbianos

Después de comprobar la capacidad de solubilización de fosfatos por parte de los microorganismos seleccionados, se procedió a cultivar las bacterias en CN durante 48 horas en agitación constante en una cámara a 30 °C. Los hongos se cultivaron en medio PDB durante 96 horas, sin agitación a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento de las células o conidios de cada tipo de cultivo, utilizando una cámara de *Neubauer*. El cálculo se realizó usando la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ}células/conidios}{n^{\circ} cuadrículas} \times 4.10^6$$

Para separar el medio de cultivo de la biomasa, las bacterias se centrifugaron (ORTO ALRESA, Digisen- 20R) a 10000 rpm durante 10 min y los hongos se filtraron utilizando un filtro de muselina estéril.

3.6.2. Inoculación de las muestras de compost e incubación

La humedad del sustrato (compost) se ajustó hasta un 60% de humedad (óptimo para el desarrollo de la actividad microbiana) en vasos de plástico de 100 mL de volumen, cubiertos con parafilm perforado para permitir ligeramente el intercambio de gases. El peso total de las muestras fue de 10 g, compuestos por 5,143 g de compost y un volumen de inóculo de 4,856 mL (inóculo ajustado para obtener una concentración final en el sustrato de 10^7 UFC/g y una humedad del 60%). Teniendo en cuenta la termotolerancia de las cepas seleccionadas para el estudio, la incubación se llevó a 30 y 40 °C. Los muestreos se realizaron al inicio, 20 y 40 días. Además de las muestras inoculadas, se utilizaron controles (sustrato humectado al 60% con agua destilada sin inocular). Todas las muestras fueron preparadas por triplicado.

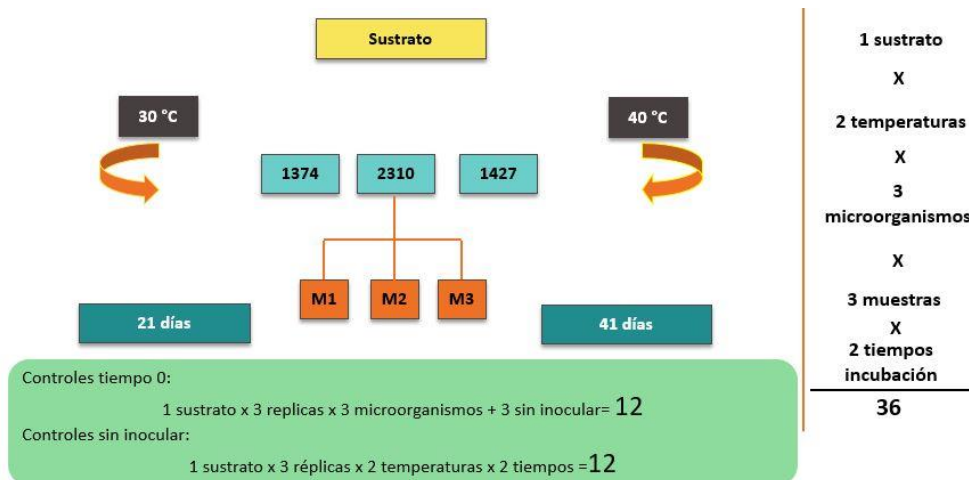


Figura 6. Protocolo de incubación.

3.6.3. Toma de muestras y conservación

Como se ha indicado anteriormente, durante el periodo de incubación se realizaron muestreos al inicio así como a los 20 y 40 días, aprovechando este momento para el reajuste de la humedad. Las muestras (1 g por muestreo) se conservaron congeladas a -20 °C hasta el momento del análisis de fraccionamiento del fósforo.

3.7. Análisis de las distintas fracciones de fósforo

Como método de análisis de fraccionamiento de fósforo se utilizó el *Standards, Measurements and Testing (SMT)*, ya que es un ensayo no secuencial, sencillo y reproducible (Ruban *et al.*, 2001).

El SMT fue propuesto por la comisión europea como protocolo para extracción secuencial del P. Con esta metodología, se pueden llegar a determinar cinco fracciones de fósforo: Fósforo Orgánico (PO), Fósforo Inorgánico (PI), Fósforo Inorgánico No Apatito (NAIP, las formas asociadas a óxidos e hidróxidos de Al, Fe y Mn) y Fosforo Total (PT).

El protocolo de fraccionamiento SMT (Ruban *et al.*, 2001) incluye tres procedimientos de extracción a partir de tres muestras independientes. Las condiciones de operación se describen en la Figura 7.

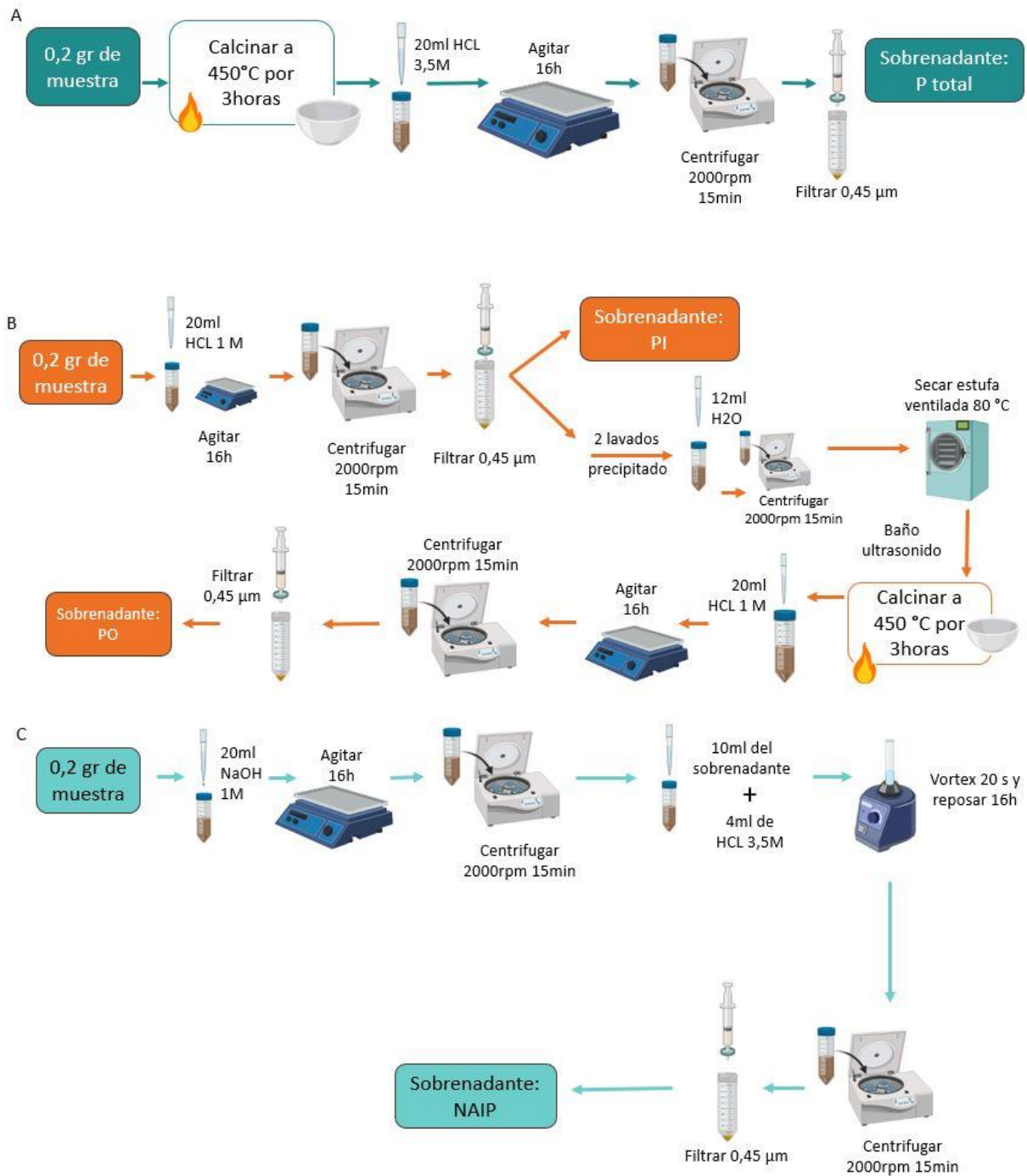


Figura 7. Protocolo fraccionamiento de fósforo SMT. A) Obtención de Fósforo Total (PT). B) Obtención de Fósforo Orgánico (PO) e y Fósforo Inorgánico (PI). C) Obtención de Fósforo No Apatito (NAIP).

3.7.1. Determinación del Fósforo total (PT)

Para la determinación del fósforo total (Figura 7A), se pesaron 0,2 g de muestra y se calcinaron en una mufla a 450 °C durante 3 horas. Al día siguiente, se añadieron 20 mL de HCL 3,5 M y se agitó durante 16 horas a 180 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se centrifugó 15 min a una velocidad de 2000 rpm. El sobrenadante fue filtrado utilizando un filtro de nitrocelulosa (Millipore) con tamaño de poro de 0,45 µm, donde queda retenido el PT.

3.7.2. Determinación de Fósforo inorgánico (PI) y Fósforo orgánico (PO)

Como se indica en la Figura 7B, a 0,2 g de muestra se añadieron 20 ml de HCL 1M y se agitó a 180 rpm durante 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó 15 min a 2000 rpm y se filtró el sobrenadante para obtener la fracción de fósforo inorgánico (PI). Se utilizó un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm.

Para la determinación del fosforo orgánico (PO) se utilizó el pellet obtenido tras la centrifugación. El precipitado se lavó dos veces con 12 mL de agua destilada, se agitó durante 5 min y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, descartándose siempre el sobrenadante. Después del lavado, el precipitado se secó utilizando una estufa ventilada a 80 °C. Posteriormente, se introdujo el residuo sólido en un baño de ultrasonido durante 10 segundos y se transfirió a un crisol para ser calcinado en una mufla a 450 °C durante 3 horas.

Las cenizas frías se pasaron a un tubo de centrifuga al que se le agregó 20 mL de HCL 1 M. Se agitó durante 16 horas a 180 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 2000 rpm durante 15 min y se filtró (0,45 µm). El extracto obtenido en este caso correspondió a la fracción de fósforo orgánico (PO).

3.7.3. Fósforo inorgánico no apatito (NAIP)

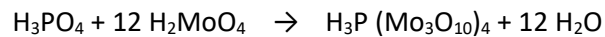
Para la determinación de NAIP (Figura 7C), se pesaron 0,2 g de muestra y se añadieron 20 ml de NaOH 1 M. Se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente y se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min. A 10 mL del sobrenadante, se le agregaron 4 mL de HCL 3,5 M y se mezcló en vortex durante 20 segundos. Tras 16 horas de reposo a temperatura ambiente, se produjo un precipitado que se separó mediante centrifugación a 2000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue filtrado (0,45 µm) para obtener el fosforo inorgánico no apatito (NAIP).

3.8. Determinación de fósforo

Para la determinación de fósforo se utilizó el método de azul de molibdeno de Bray y Kurtz (1945), empleando un espectrofotómetro (BioTek, Eon). Este protocolo se basa en un método colorimétrico empleada para la cuantificación de P extraído a partir de suelos ácidos. Es una técnica sencilla de aplicar y presenta buena repetitividad.

El fundamento radica en medir el color que adquieren los productos de reducción de los llamados heteropoliácidos de fósforo. Estos se forman mediante la coordinación de grupos molibdato que en medio ácido substituyen a los átomos de oxígeno del grupo fosfato. Su reducción produce un

color azulado (azul de molibdeno), se utiliza como reductor el ácido 1,2,4-aminonaftol sulfónico en medio ácido (López *et al.*, 2010).



Los reactivos empleados en el procedimiento fueron los siguientes:

- **Reactivo A:** se disolvieron 10 g de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ en 85 mL de agua destilada. Esta solución se mezcló con otra solución formada por 16 mL de agua destilada y 170 mL de HCl concentrado.
- **Reactivo B:** se mezclaron 2,5 g de ácido 1,2,4-aminonaftol sulfónico con 5 g de NaSO_3 y 146,25 g de NaHSO_3 , triturándose hasta obtener un polvo homogéneo. Se disolvieron 3 g de esta mezcla en 50 mL de agua destilada caliente (es importante el orden).

Para realizar la recta patrón se prepararon disoluciones de 10, 20, 50, 100, 200, 350, 500 ppm de P_2O_5 .

Procedimiento:

Para preparar la recta patrón se añadieron a tubos Falcon 2 ml de cada una de las soluciones patrón de P_2O_5 (10, 20,50,100, 200, 350, 500 mg kg^{-1} de P_2O_5). Otro tubo se dejó como control con 2 mL de agua destilada (blanco), Posteriormente, se añadieron 10 ml de agua destilada, 0,5 ml de reactivo A y 0,5 ml de reactivo B. Se agitó vigorosamente para asegurar una correcta homogenización y se dejó reposar en oscuridad durante 1 hora.

Para el análisis de la muestra, en un tubo Falcon se añadieron 2mL del extracto problema, 10 ml de agua destilada, 0,5 ml de reactivo A y 0,5 ml de reactivo B, y se procedió de igual forma a la descrito anteriormente para las muestras pertenecientes a la recta patrón.

Transcurrida la hora de incubación se midió la absorbancia de todas las muestras a una longitud de onda de 660nm (incluidas las correspondientes a la recta patrón) y de las muestras.

La medida de las distintas fracciones de fósforo a partir de las muestras extraídas se calculó a partir de la recta de regresión obtenida mediante la recta patrón utilizando Microsoft Excel 365.

3.9. Determinación del pH del sustrato

Para medir el pH del sustrato se tomó una muestra de 0,5 gr del compost inoculado en 4,5 ml de agua destilada, y se agitó durante 5 min a 30 °C. La medición del pH se realizó mediante un pH-metro (Crisol basic 30). La medida del pH se realizó al inicio del ensayo de bioaumentación así como en las muestras recogidas a los 20 y 40 días de incubación.

3.10. Análisis de datos

Para evaluar la influencia de los distintos factores de variabilidad sobre el análisis de las distintas fracciones de fósforo se realizó un análisis de varianza ANOVA multifactorial y un test de mínima diferencia significativa de Fisher. Se realizó un análisis de correlación de Pearson teniendo en cuenta las distintas variables del estudio así como un análisis de factores discriminantes. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurión XVI versión 18 (StatPoint, Inc., Virginia), a un nivel de confianza del 95%.

4. Resultados

4.1 Selección de microorganismos solubilizadores de fosfato

En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo dirigido a la detección de capacidad de solubilización de fosfatos de la colección de cepas, mediante siembra en medio PKV a dos temperaturas diferentes. Teniendo en cuenta la termotolerancia de las cepas, el ensayo se llevó a cabo a dos temperaturas, 30 y 40 °C. A 30 °C se observó que todas las bacterias (Figura 8A) generaron un halo de aclaramiento de dimensiones similares. En relación a los representantes fúngicos, dicho halo solo pudo observarse en la cepa 4217 (Figura 8C) y en la cepa 4783 (Figura 8D), mientras que no se detectó a partir de ninguna de las levaduras del ensayo (Figura 8B). Dichas pruebas, como se mencionó anteriormente, se realizaron a 40 °C obteniendo los mismos resultados.

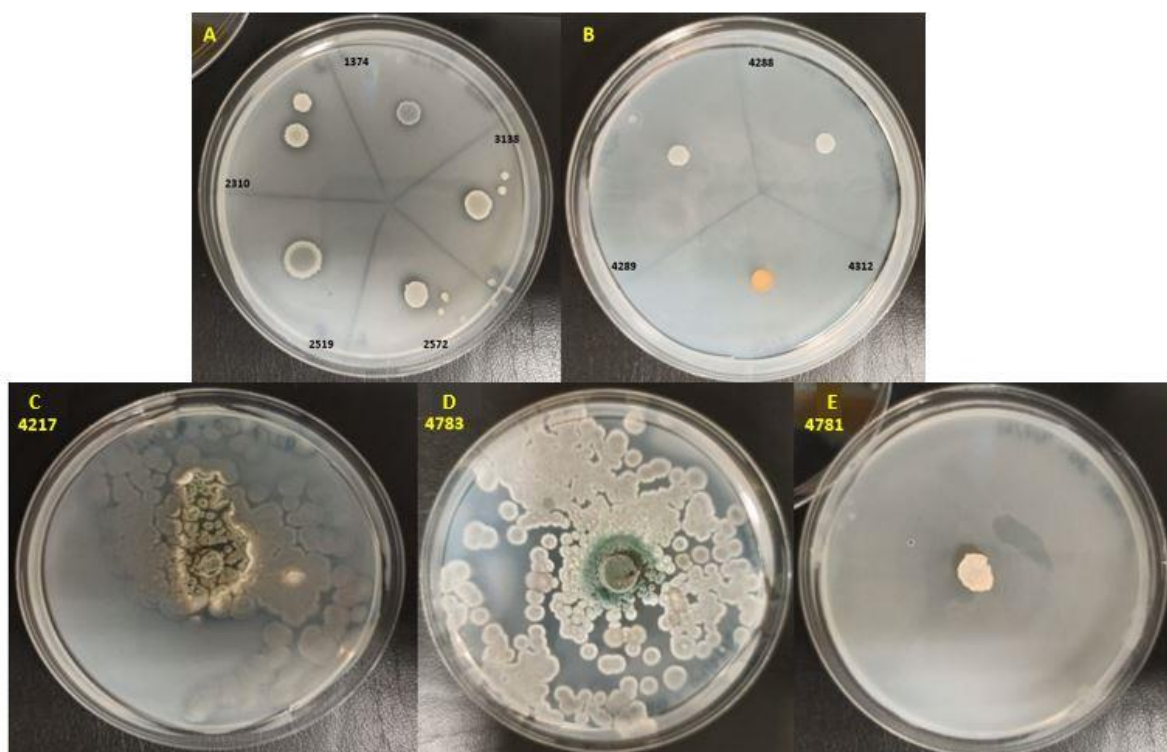


Figura 8. Microorganismos en agar PKV a 30 °C. (A) Bacterias: cepas 1374,2310,2519,2572 y 3138. (B) Levaduras: cepas 4288,4289 y 4812. (C, D y E) Hongos: cepas 4217,4783 y 4781, respectivamente.

En función de los resultados obtenidos en este primer *screening* cualitativo, se seleccionaron las 3 cepas indicadas en la Tabla 8, las cuales, como se indicó en el apartado 3.2., habían sido previamente aisladas de procesos de compostaje de restos lignocelulósicos. Se seleccionaron dos cepas del género *Bacillus*, la cepa 1374 y la cepa 2310. Este género ha sido ampliamente estudiado por su capacidad para solubilizar fosfatos y otras características que lo hacen ideal como bioinoculante del suelo, como indica Xu *et al.* (2019). Estos autores utilizaron una cepa de *Bacillus licheniformis* proveniente de la fase termófila de un compost, y determinaron que posee múltiples genes que codifican para monooxigenasas líticas (LPMO) que actúan en la despolimerización de la lignocelulosa, reportando la gran importancia de este proceso en la humificación del compost. En el estudio realizado

por Kumar *et al.* (2021), estudiaron la capacidad de producción de sideróforos de *Bacillus aerophilus* en combinación con *Pseudomonas*, determinando que es una alternativa muy eficiente para la descontaminación de los suelos con altos grados de cobre, debido a su capacidad de absorción de este metal, y a que promueve el crecimiento vegetal.

Como representante fúngico, se seleccionó en este primer bloque experimental la cepa 4217, identificada como *Penicillium sp.* El género *Penicillium* está muy relacionada con la microbiota del suelo, habiendo sido ampliamente estudiado debido a su capacidad promotora del crecimiento vegetal y solubilizadora de fosfatos (Qarni *et al.*,2021).

Tabla 8. Microorganismos solubilizadores de fosfato seleccionados para inocular en el sustrato.

Número	Nombre
1374	<i>Bacillus sp.</i>
2310	<i>Bacillus sp.</i>
4217	<i>Penicillium sp.</i>

4.2 Análisis de las distintas fracciones de fósforo

4.2.1. Análisis descriptivo

- **Fosforo total (PT):**

En la Figura 9 se muestra la concentración de fósforo total a partir de cada una de las muestras inoculadas con las cepas seleccionadas en el apartado anterior. Los resultados obtenidos a partir de la incubación de las muestras a 30 °C (Figura 9A) mostraron tendencias similares. Aunque presentaron mayor concentración a tiempo cero las muestras inoculadas, la concentración de fósforo total en los sucesivos tiempos de muestreo fue inferior a la mostrada en el control. El valor máximo de concentración de PT se obtuvo para el control a los 40 días (328 ppm). Al realizar la prueba de múltiple rango respecto al control, se formaron 2 grupos de homogeneidad para cada uno de los diferentes tiempos de muestreo. Cuando las muestras se incubaron 40 °C (Figura 9B) se observaron valores ligeramente superiores a los detectados a 30 °C, con la excepción de las muestras tratadas con la cepa 1374. En este tratamiento se detectó un 35% y un 62% menos de fósforo total después de 20 y 40 días de incubación, respectivamente. Todo ello quedó patente al realizar la prueba de múltiple rango respecto al control para la cual se formaron 2 grupos de homogeneidad diferentes a tiempo cero y 20 días, y 3 grupos de homogeneidad para las muestras correspondientes al muestreo 40 días, siendo el tratamiento 1374 el que presentó mayores diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Estas diferencias encontradas entre los tratamientos a diferente temperatura podrían deberse a la mayor o menor tolerancia térmica de las cepas, así como a la regulación de las vías metabólicas y expresión enzimática, altamente dependiente de la temperatura de incubación. Esta misma premisa podría extrapolarse al resto de fracciones de fósforo que se explicaran en los apartados siguientes. (Choma *et al.*, 2000).

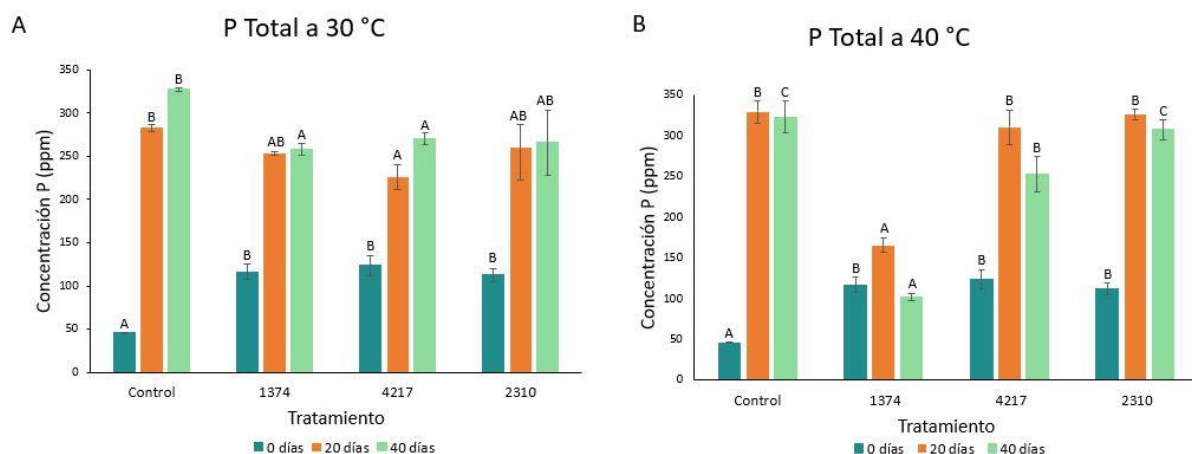


Figura 9. Representación del fósforo total (PT) en los diferentes tratamientos a distintas temperaturas de incubación. (A) 30 °C y (B). 40 ° C. Las letras sobre las barras de error informan de los grupos de homogeneidad derivados del análisis de múltiple comparación (LSD 95%) en función de cada tratamiento

- **Fosforo orgánico (PO):**

Los valores de fósforo orgánico a partir de los distintos tratamientos se encuentran representados en la Figura 10. A 30 °C (Figura 10A), la cepa 4217 mostró un perfil similar al control, es decir, la concentración de fósforo orgánico aumentó de forma continuada a lo largo del periodo de estudio. La concentración de fósforo orgánico, en el caso de la cepa 4217 tras 40 días de incubación, presentó el máximo valor de fósforo orgánico detectado (138 ppm) respecto al resto de tratamientos, aunque no fue significativamente diferente a lo obtenido en el control sin inocular. En términos generales, los valores de PO fueron menores a partir de los tratamientos con las cepas 1374 y 2310. Para profundizar un poco más, se realizó la prueba de múltiples rangos respecto al sustrato no inoculado, en la cual se formaron 2 grupos de homogeneidad diferentes a tiempo cero y 3 en los otros dos tiempos de muestreo. A la temperatura de incubación de 40 °C (Figura 10B), tanto el control como las muestras tratadas con las cepas 1374 y 4217 mostraron un perfil de PO muy similar entre sí. Al realizar la prueba de múltiples rangos respecto a la muestra sin inocular, se observó que a tiempo cero se formaron 2 grupos de homogeneidad, pero un único grupo de homogeneidad en el análisis de los datos a 20 y 40 días de muestreo, lo cual indicó que no grandes diferencias entre los diferentes tratamientos y el control, en las muestras incubadas a 40 °C. El hecho de que no haya diferencias estadísticamente significativas respecto al control puede deberse a que, probablemente existe un predominio de la remineralización e inmovilización microbiana, al menos durante las primeras semanas de incubación. Durante períodos de tiempo más prolongados, aumenta la importancia relativa de la mineralización del fósforo orgánico (Bünemann, 2015). Además, los resultados podrían ser explicados por lo indicado por Walker y Syers (1976), quienes determinaron que la biomasa microbiana representa hasta el 40% del PO total, fracción que juega un papel central en la dinámica del fósforo del suelo. Por lo cual, es más que probable que la inoculación microbiana de suelos, compost u otros sustratos genere diferencias respecto al contenido en PO, que pueden detectarse desde el inicio del tratamiento.

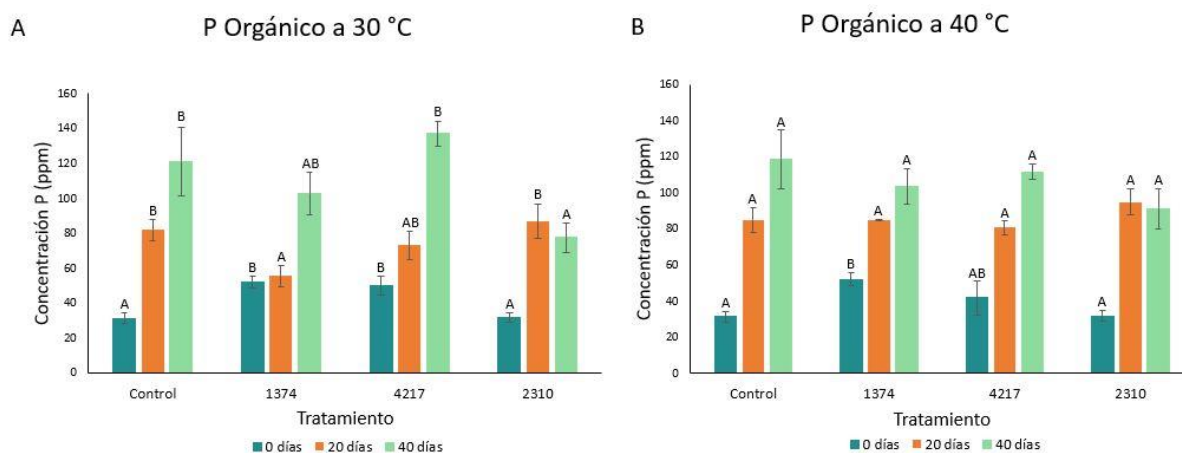


Figura 10. Representación del fósforo orgánico (PO) en los diferentes tratamientos a distintas temperaturas de incubación. (A) 30 °C y (B) 40 °C. Las letras sobre las barras de error informan de los grupos de homogeneidad derivados del análisis de múltiple comparación (LSD 95%) en función de cada tratamiento

- **Fosforo inorgánico (PI):**

En lo referente al fósforo inorgánico (Figura 11), el cual se detectó a concentraciones más elevadas que el fósforo orgánico (Figura 10), mostró un patrón similar a tiempo cero a partir de los tratamientos realizados a diferentes temperaturas. En todos los casos se obtuvieron las concentraciones más elevadas de PI después de 40 días de incubación. En la Figura 11A se muestran los resultados obtenidos para las muestras incubadas a 30 °C. Las muestras sometidas al tratamiento con la cepa 1374 mostraron un perfil similar al presentado por el sustrato sin inocular, mientras que las tratadas con las cepas 2310 y 4217 apenas mostraron variación entre sí durante, al menos, los 20 primeros días de muestreo. El máximo valor detectado para esta fracción a 30 °C correspondió a la muestra incubada durante 40 días previamente tratada con la cepa 1374 (280 ppm). En cuanto a la prueba de múltiple rango realizada respecto a la muestra sin inocular, se obtuvieron 3 grupos de homogeneidad a tiempo cero y 2 grupos de homogeneidad para las muestras pertenecientes a los muestreos realizados a 20 y 40 días desde el inicio del proceso. Por otro lado, a 40 °C (Figura 11B) el tratamiento con la cepa 1374 dio lugar a una mayor concentración de fósforo inorgánico a los 20 días de muestreo (280 ppm), mientras que valores similares no se alcanzaron hasta después de 40 días de muestreo en las muestras tratadas con la cepa 4217. La prueba de rango múltiple respecto al control para los resultados obtenidos a 40 °C fue similar en cuanto al número de grupos de homogeneidad formados para cada uno de los tiempos de incubación, siendo las muestras tratadas con la cepa 1374 las que mostraron mayores diferencias significativas respecto al sustrato sin inocular.

Según autores como Hinsinger (2001) y Lindsay (1979), los iones ortofosfato ($H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}), que provienen del fósforo inorgánico, se encuentran en altas proporciones a pH superiores a 7,2, siendo biodisponibles para las plantas. Estos resultados respaldarían las elevadas concentraciones de PI detectadas ya que, como se indicará más adelante, se trabajó en un rango de pH de 8,7-9,1.

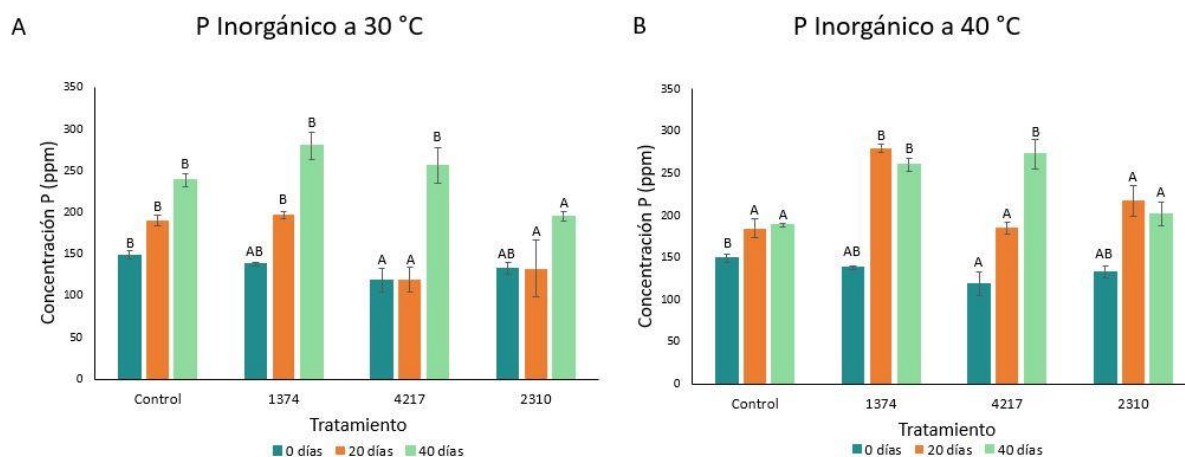


Figura 11. Representación del fósforo inorgánico (PI) en los diferentes tratamientos a distintas temperaturas de incubación. (A) 30 °C y (B) 40 °C. Las letras sobre las barras de error informan de los grupos de homogeneidad derivados del análisis de múltiple comparación (LSD 95%) en función de cada tratamiento

- **Fósforo inorgánico no apatito (NAIP):**

En la Figura 12 se muestra la concentración de fósforo inorgánico no apatito (NAIP) para cada una de las muestras analizadas. Esta fracción de fósforo fue detectada a concentraciones muy inferiores a las observadas en el caso del fósforo orgánico. A 30 °C (Figura 12A) los valores de concentración fueron muy similares tras 20 y 40 días de incubación. Esto quedó patente tras analizar los datos mediante la prueba de múltiple rango respecto al control, ya que quedaron englobados dentro de un mismo grupo de homogeneidad. En cambio, a 40 °C (Figura 12B) sí que se apreciaron diferencias entre los tratamientos a lo largo del proceso. El máximo valor detectado fue a los 20 días con el tratamiento de la cepa 2310 (57 ppm). En cuanto al análisis de múltiple rango realizado respecto al control, se formaron 3 grupos de homogeneidad para todos los tiempos de estudio, indicando que a dicha temperatura si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos y el sustrato sin inocular. Wyciszkievicz *et al.* (2017) y Hinsinger (2001) reportaron resultados que concuerdan con los obtenidos para la cepa 2310, ya que observaron que a 40 °C la cepa de *Bacillus megaterium* fue la más eficiente en solubilización de fosfatos a pH 7. Por ello, en dicho trabajo se postula el género *Bacillus* como candidato ideal para su uso como biofertilizante, el cual es usado en este trabajo como inoculante (cepa 1374 y cepa 2310). Por otra parte, según autores como Efthymiou *et al.* (2018), el género *Penicillium* es también muy utilizado para la conversión de fósforo inorgánico insoluble en iones más lábiles para las plantas. Incluso se venden comercialmente algunas formulaciones que se emplean para el enriquecimiento del suelo mediante bioaumentación, con objeto de obtener mayor cantidad de fósforo biodisponible para las plantas.

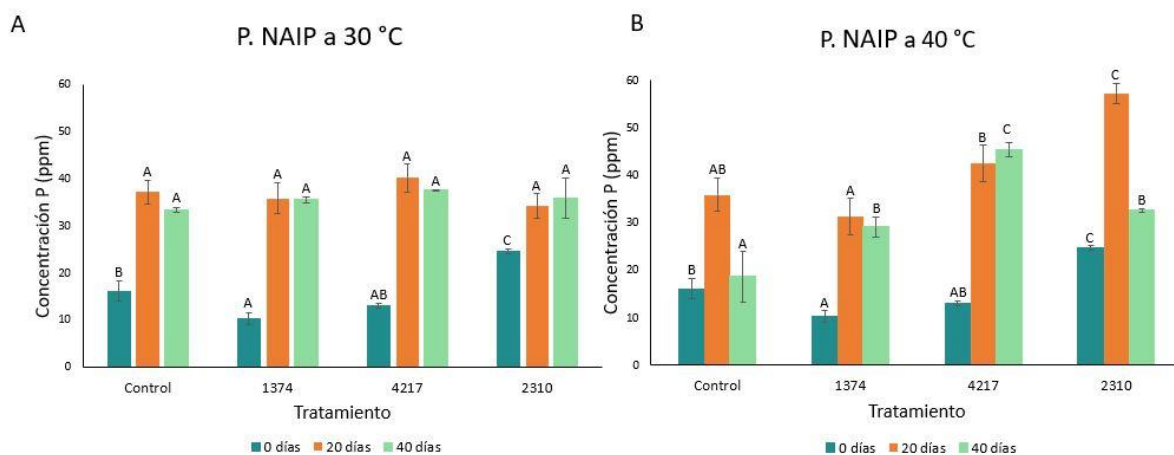


Figura 12. Representación del fósforo inorgánico no apatito (NAIP) en los diferentes tratamientos a distintas temperaturas de incubación. (A) 30 °C y (B) 40 °C. Las letras sobre las barras de error informan de los grupos de homogeneidad derivados del análisis de múltiple comparación (LSD 95%) en función de cada tratamiento

4.2.2. Estudio de la variable pH en el sustrato.

El pH del suelo es un factor muy importante en la transformación del fosfato orgánico a inorgánico, por lo que la producción de diferentes ácidos orgánicos de origen microbiano puede repercutir en este fenómeno, provocando de algún modo cambios en las distintas fracciones de fósforo, así como en la solubilización del mismo (Mpanga *et al.*, 2020). En la Figura 13 A y B se muestran los valores de pH de las diferentes muestras a las diferentes temperaturas de incubación. En todos los casos, este osciló entre 8,7 y 9,1. Tras realizar la prueba de múltiple rango respecto al sustrato sin inocular (datos no mostrados), se comprobó que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tratadas y el control (solo se formó un grupo de homogeneidad). Xu *et al.* (2015) mostró la influencia tan fuerte que existe entre el pH y la concentración de las diferentes fracciones de fósforo que se puede detectar. Según Scervino *et al.* (2010), algunas cepas del género *Bacillus*, como la cepa 1374 y la cepa 2310, producen mezclas de ácidos (isobúrico, láctico, isovalérico y acético), bajo esta combinación de ácidos, la solubilización de minerales de calcio es menor que con otros ácidos, por lo cual, cada cepa de *Bacillus* tiene un comportamiento diferente en cuanto a la solubilización de fosfatos. A pesar de esto Saeid *et al.* (2018) reportó que no se produjeron cambios significativos del pH en los sustratos con mayor cantidad de materia orgánica, debido a que algunos compuestos presentes en el medio posiblemente podrían neutralizar los ácidos producidos, limitando así los cambios de pH

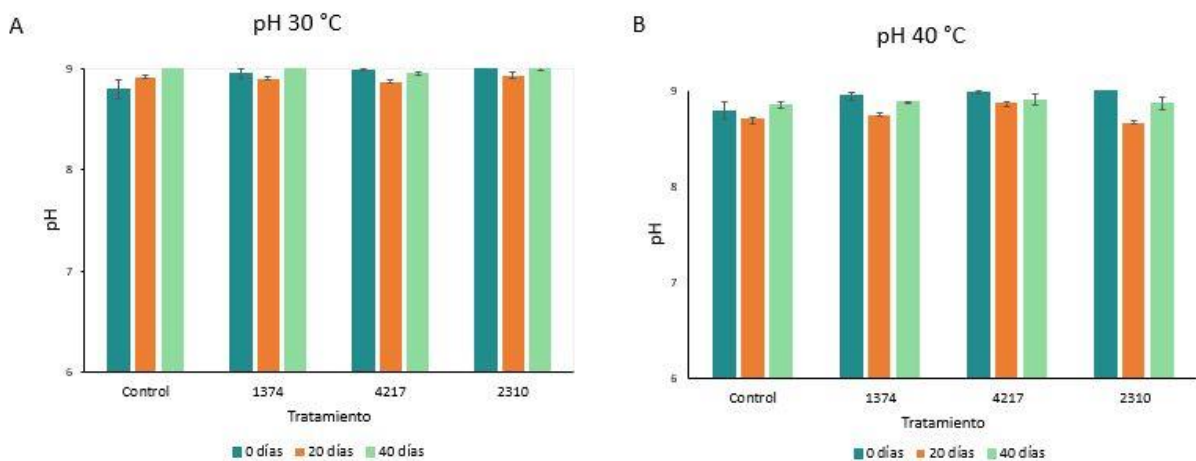


Figura 13. Representación del pH en los diferentes tratamientos (A) 30 °C y (B) 40 ° C

4.2.3. Análisis de correlación en función de la cepa seleccionada.

Para una mayor comprensión de los resultados obtenidos, se realizaron diversos análisis estadísticos. En la Figura 14 se observan diferentes gráficos correspondientes al análisis de correlación de Pearson ($p < 0.05$) entre las diferentes fracciones de P y el pH en función de cada tratamiento: control sin inocular (Figura 14A), tratamiento 1374 (Figura 14B), tratamiento 4217 (Figura 14C) y tratamiento 2310 (Figura 14D). Además de las peculiaridades encontradas para cada uno de los tratamientos y el control, se observó que en todos los casos se produjo una correlación positiva entre el NAIP-PT y PO-PI. Con la excepción del tratamiento 1374, en los otros tres casos de estudio, el PT se correlacionó positivamente con el PO y PI, lo cual concuerda con los resultados presentados por muchos autores que afirman que la ecuación $PT = PO + PI$ es una aproximación matemática de la cual se obtienen valores que no distan demasiado de los obtenidos de manera independiente (García-Albacete *et al.*, 2012; Pardo *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2015).

En la Figura 14A, el fósforo inorgánico fue el único que se correlacionó, de manera positiva, con el pH (0,60). Estos resultados difieren de los reportados por Richardson *et al.* (2011), quien demostró que, durante el proceso de mineralización, que realizan los microorganismos solubilizadores de fosfatos, el fósforo orgánico se transforma en fósforo más lábil a través de ácidos orgánicos que acidifican el suelo. En cuanto al tratamiento con la cepa 1374 (Figura 14B), ninguna de las fracciones dependió del pH, de la misma manera que las fracciones de PO y PI en las muestras inoculadas con la cepa 4217 (Figura 14C). Por otro lado, en este mismo tratamiento, las fracciones de PT y de NAIP mostraron correlación negativa con el pH (-0,70 y -0,60, respectivamente), lo que justifica que, a menor pH, la determinación de dichas fracciones de P es mayor y viceversa. En lo que respecta a las fracciones de fósforo cuantificadas en el tratamiento con la cepa 2310, se pudo comprobar que todas las fracciones correlacionaron de manera negativa con el pH (Figura 14 D). Los resultados relativos al pH concuerdan con los obtenidos por Richardson *et al.* (2007). Estos autores reportaron que cuanto más ácido es un suelo mayor es la concentración de PT, PO y PI detectado. A pesar de esto, Raymond *et al.* (2021) y Bünemann (2015) han descrito lo complejo que es identificar el efecto real del pH ya que no solo afecta al propio del suelo, sino que hay que tener en cuenta el pH óptimo para el crecimiento de

cada microorganismo, lo cual afecta directamente a la versatilidad metabólica de cada cepa y, por ende, a su capacidad de solubilizar fosfato.

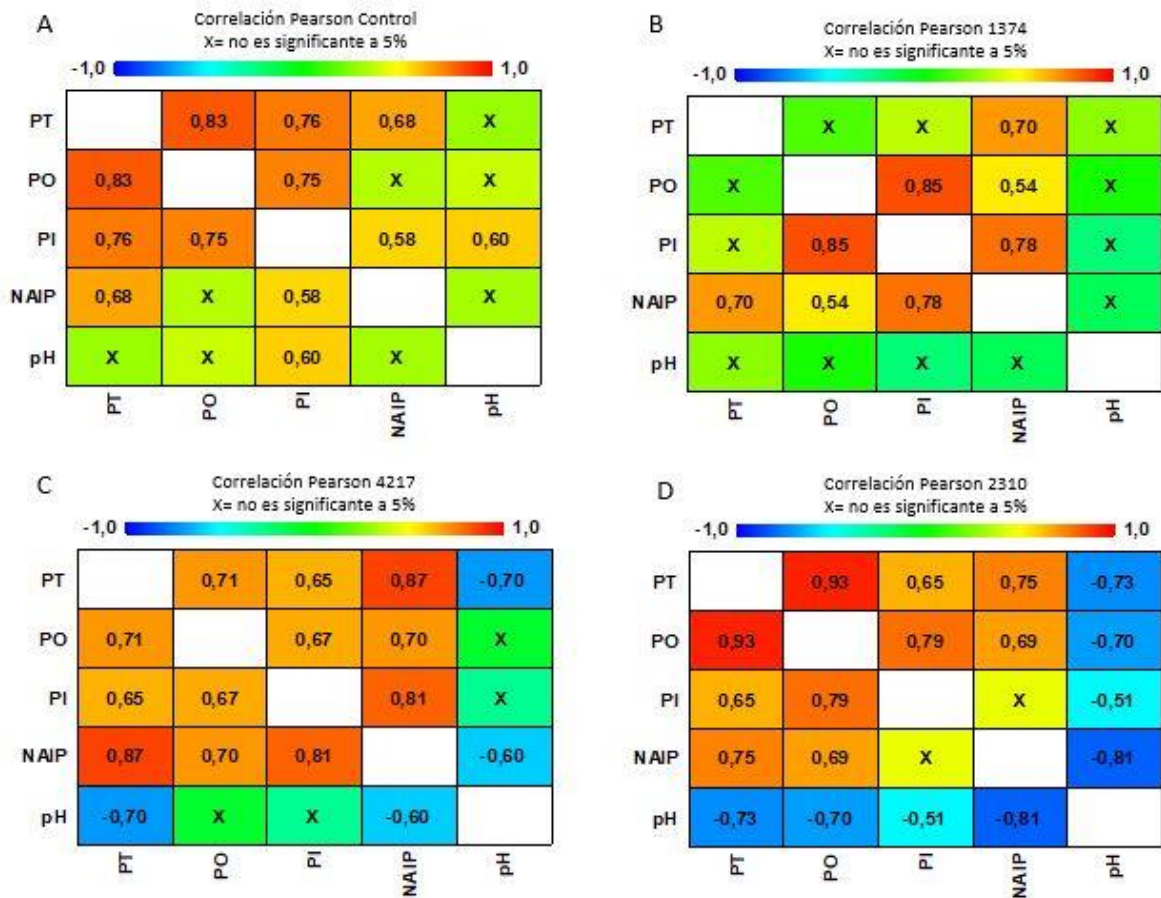


Figura 14. Correlación de Pearson entre las diferentes fracciones de fósforo y el pH. Fósforo total (PT), Fósforo orgánico (PO), Fósforo inorgánico (PI), Fósforo inorgánico apatito (NAIP). (A) Control, (B) cepa *Bacillus* sp. 1374, (C) cepa *Penicillium* sp. 4217, (D) cepa *Bacillus* sp. 2310

4.2.4. Interacciones entre cepas en las diferentes fracciones de fosfato

En las Figuras 15 y 16 se muestra la variación de las fracciones de P para cada una de las muestras de estudio en función de las interacciones entre los factores tiempo de muestro x tratamiento y temperatura de incubación x tratamiento, respectivamente. En la Figura 15A, en la cual se observan los resultados obtenidos para PT respecto al tiempo de muestreo, la muestra inoculada con la cepa 1374 presentó menor concentración de fosforo total a lo largo del tiempo, sin embargo, las muestras inoculadas con la cepa 4217 y la 2310 tienen comportamientos muy parecidos. Además, en la Figura 16A, en la que el factor tiempo se sustituye por el factor temperatura, se observa como en las muestras inoculadas con la cepa 1374 disminuye la detección de fosforo total tras incubación a 40 °C. Determinar cómo varía la cantidad de cualquier fracción de fosfato con respecto a la temperatura puede resultar, por tanto, de enorme interés durante el proceso de compostaje, ya que a lo largo del proceso, ésta sufre grandes fluctuaciones, llegando a alcanzar en la fase termófila los 70

°C. De igual modo, la tolerancia térmica de los microorganismos aislados de compost puede ser determinante a la hora de transformar las distintas fracciones de fósforo (Sánchez *et al.*, 2017).

En cambio, cuando se observa el gráfico de interacciones entre tiempo x tratamiento con respecto al fósforo orgánico (PO) (Figura 15B), el comportamiento del sustrato sin inocular y del inoculado con las cepas 4217 y 1374 es muy similar, mostrando un claro incremento de la fracción de PO a lo largo del tiempo de incubación. Este efecto fue diferente al observado en las muestras tratadas con la cepa 2310, ya que la fracción de PO se incrementó a los 20 días, para luego descender ligeramente al final del ensayo. En la Figura 16B se puede apreciar que la detección de fósforo orgánico es mayor a 30 °C y disminuye drásticamente a 40 °C en los sustratos inoculados con el hongo 4217. El efecto opuesto ocurrió en los sustratos inoculados con las cepas de *Bacillus* 1374 y 2310, mientras que en los sustratos no inoculados (control) no se observaron diferencias significativas entre ambas temperaturas.

La fracción de PI se representa en la Figura 15C. En todos los casos se observó un incremento de la fracción de PI a lo largo del tiempo, excepto en la muestra inoculada con la cepa 2310, después de 40 días de incubación. Por otro lado, en la Figura 16C, se observa que para todos los tratamientos, con la salvedad del inoculado con la cepa 1374, disminuye la detección de fosforo inorgánico a 40 °C.

El gráfico que representa la fracción de NAIP respecto a la interacción entre tiempo x tratamiento (Figura 15D) muestra que todos los sustratos inoculados presentan una mayor cantidad de NAIP que el control, al final del proceso. Este fenómeno concuerda con los resultados obtenidos por Gomes *et al.* (2014), quienes reportaron buenos resultados en relación con la capacidad de solubilizar fosfatos propia de varias cepas de los géneros *Bacillus*, *Burkholderia* y *Penicillium*. Los sustratos inoculados con las cepas 1374 y la 4217 mostraron un comportamiento muy parecido, mientras que los sustratos inoculados con la cepa 2310, mostraron un máximo de NAIP tras 20 días de incubación. En cuanto a la temperatura de incubación (Figura 16D), los sustratos inoculados con ambas cepas mostraron la mayor concentración de NAIP a 40 °C, mientras que los sustratos inoculados con la cepa 1374 mostraron valores más bajos de NAIP a 40 °C, al igual que las muestras no inoculadas. Hay que tener en cuenta, que el NAIP es aquel que se encuentra unido a óxidos e hidróxidos de hierro, aluminio y manganeso. Esta fracción de fósforo a pH ácido se encuentra en forma de cristales lo cual lo hace insoluble. En cambio, al pH en el que se han presentado estas muestras, se encuentra de manera lábil y más accesible para los microorganismos (Hinsinger, 2001).

En la Figura 17 se muestran los análisis discriminantes realizados para cada uno de los tratamientos utilizados en este trabajo (incluido el control), respecto al tiempo de muestreo. En todos los casos, se obtuvieron dos funciones discriminantes que explicarían más del 99,90% de la variabilidad de los datos obtenidos. Además, los datos se agruparon en tres grupos, el que se corresponde con el tiempo 0 se encuentra en general más alejado de los grupos formados por los datos correspondientes a los tiempos 20 y 40, los cuales se encuentran muy próximos entre sí. En la Figura 18 se realizó un análisis de correlación de Pearson global ($p < 0,05$) de las diferentes fracciones de P y el pH. En ella se puso de manifiesto que sólo la fracción de NAIP presentó una correlación negativa con el pH (- 0,25). En general, el principal mecanismo microbiano de solubilización de fosfatos es la producción de ácidos orgánicos, lo que tiene como consecuencia la disminución del pH y el incremento de la fracción de

NAIP. En el NAIP está unido el fósforo a óxidos e hidróxidos de metales (Mn, Fe y Al), a pH alcalinos empiezan a solubilizarse, dejando libre los iones de ortofosfato que se encuentran en forma biodisponible para las plantas (Saeid *et al.* 2018; Lindsay *et al.* 1989).

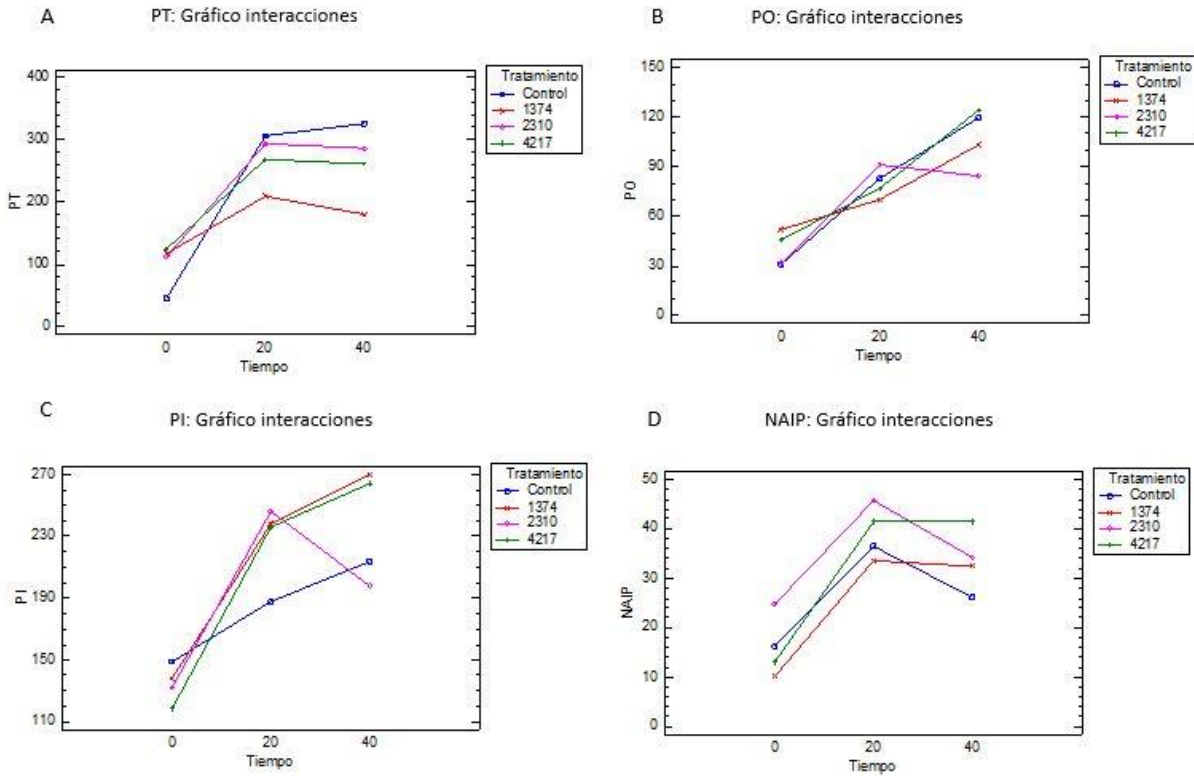


Figura 15. Diferentes fracciones de fósforo entre el control y los sustratos inoculados con diferentes cepas durante tres tiempos 0 días, 20 días y 40 días. (A) Fósforo total PT, (B) Fósforo orgánico PO, (C) Fósforo inorgánico PI, (D) Fósforo inorgánico no apatito (NAIP)

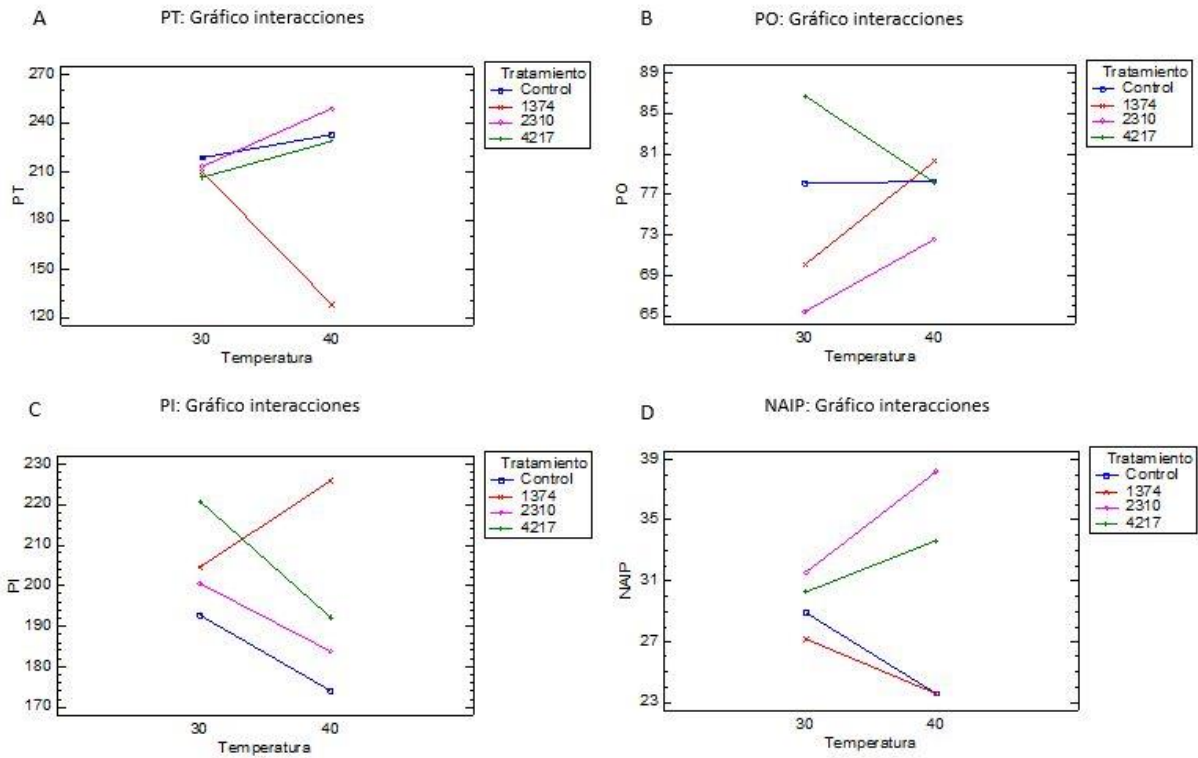


Figura (16). Diferentes fracciones de fósforo entre el control y los sustratos inoculados con diferentes cepas a temperatura 30 °C y 40 °C. (A) Fósforo total PT, (B) Fósforo orgánico PO, (C) Fósforo inorgánico PI, (D) Fósforo inorgánico no apatito (NAIP)

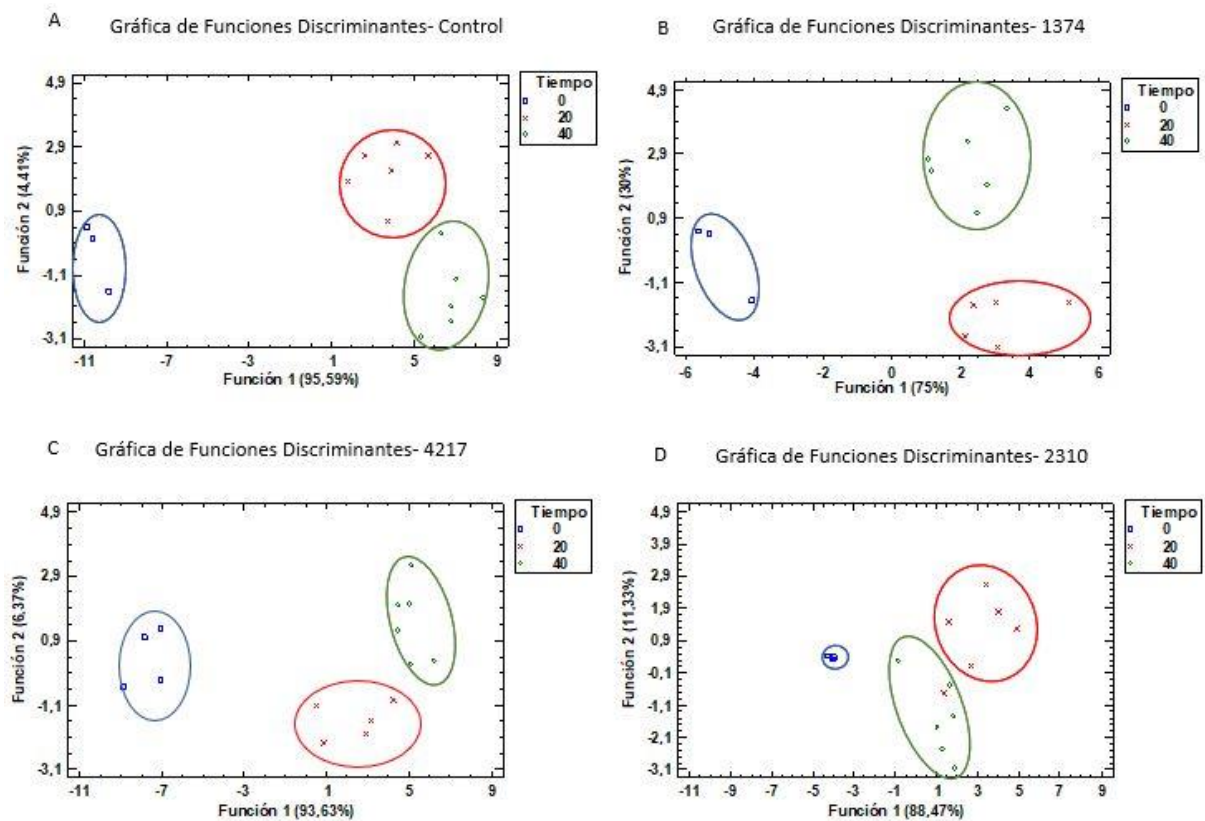


Figura 17. Análisis discriminante. (A) Control, (B) *Bacillus* 1374, (C) *Penicillium* 4217, (D) *Bacillus* 2310.

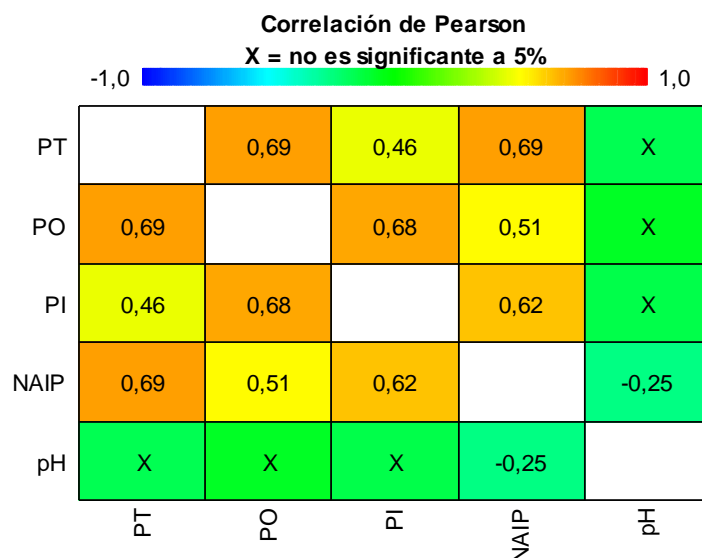


Figura 18. Correlación de Pearson del control y todas las cepas con respecto a todas las fracciones de fosfato. Fósforo total (PT), fósforo orgánico (PO), fósforo inorgánico (PI), fósforo inorgánico apatito (NAIP) y pH.

Algunos autores han reportaron la importancia de determinados factores a la hora de utilizar una cepa como inoculante microbiano de carácter fertilizante. Algunos de estos factores a tener en cuenta son: tolerancia a la temperatura y pH, patrón de producción de ácidos orgánicos, versatilidad metabólica, etc., lo cual va a influir directamente en la capacidad solubilizadora de fosfato de la cepa en cuestión (Oliveira *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2011). A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo es evidente que la inoculación con las distintas cepas microbianas dio lugar a comportamientos muy diferentes en lo que se refiere a la movilidad y *turnover* de las distintas fracciones de fósforo. En cualquier caso, en comparación con los datos derivados de las muestras no inoculadas, los resultados fueron muy prometedores, ya que la inoculación con agentes solubilizadores de fósforo, provocó importantes cambios en el perfil de las fracciones de fósforo, favoreciendo el incremento de las fracciones inorgánicas más solubles

5.CONCLUSIONES

1. El protocolo SMT para fraccionamiento de fósforo es un método rápido y sencillo que puede utilizarse en el estudio de muestras de compost y otros sustratos similares.
2. El compost es una enmienda idónea para utilizarse en procesos de bioaumentación debido a su carácter estable y a su alto contenido en nutrientes potencialmente fitodisponibles.
3. La inoculación de compost con cepas microbianas solubilizadoras de fosfato dio lugar a comportamientos muy diferentes y prometedores en lo que se refiere al *turnover* de las distintas fracciones de fosforo en el sustrato inoculado. La movilidad de las distintas fracciones fue muy dependiente de la cepa, así como de la temperatura, pH y tiempo de incubación.
4. La mineralización del fósforo orgánico hacia otras fracciones más disponibles para la planta se vio mejorada con la inoculación de microorganismos solubilizadores de fosfato, incrementándose en general la fracción de fosforo inorgánico, e incluso en ocasiones el fósforo inorgánico no apatito (NAIP)

BIBLIOGRAFIA

Albacete, M. G. (2014). Residuos orgánicos como fuentes de fósforo (Doctoral dissertation, Universidad Politécnica de Madrid).

Beltrán M. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15, 101-113.

Bernal, M. P., Albuquerque, J. A. y Moral, R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*, 100(22), 5444-5453.

BOE-A-2017-14332, 2017. Real Decreto 999/2017. Regulación española sobre productos fertilizantes.

Bobadilla, C. y Rincón, S. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. 67.

Bray, R. y Kurtz, L. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Canadian Journal of Soil Science*, 59, 39-45.

Bünemann, E. K. (2015). Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus—A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 82-98.

Choma, C., Clavel, T., Domínguez, H., Razafindramboa, N., Soumille, H., Nguyen-the, C. y Schmitt, P. (2000). Efecto de la temperatura sobre las características de crecimiento de *Bacillus cereus* TZ415. *Revista Internacional de Microbiología Alimentaria*, 55 (1-3), 73-77.

Efthymiou, A., Grønlund, M., Müller-Stöver, D. y Jakobsen, I. (2018). Augmentation of the phosphorus fertilizer value of biochar by inoculation of wheat with selected *Penicillium* strains. *Soil Biology and Biochemistry*, 116, 139-147.

Fernández, L. A., Zalba, P., Gómez, M. A. y Sagardoy, M. A. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del suelo*, 23(1), 31-37.

Füleký, G. y Benedek, S. (2010). Composting to recycle biowaste. In *Sociology, organic farming, climate change and soil science*. Springer. 319-346.

García-Albacete, M., Martín, A. y Cartagena, M. C. (2012). Fractionation of phosphorus biowastes: characterisation and environmental risk. *Waste Management*, 32(6), 1061-1068.

Gomes, E., Silva, U., Marriel, I., De Oliveira, C. y Lana, U. (2014). Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Brazilian Journal of Maize and Sorghum*, 13(1), 69-81.

Harrison, A. F. (1987). Mineralisation of organic phosphorus in relation to soil factors, determined using isotopic ³²P labelling. *CAB International*, 84-87.

Havlin, J. L., Beaton, J. D., Tisdale, S. L. y Nelson, W. L. (2005). *Soil Fertility and Fertilizers*. Pearson Education. Inc. Upper Saddle River, N J.

Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, 237(2), 173-195.

INTAGRI. (2017). Síntomas Visuales de Deficiencia de Fósforo en los Cultivos. INTAGRI. México. 103: 4 p.

Kumar, A., Maleva, M., Bruno, L. B. y Rajkumar, M. (2021). Synergistic effect of ACC deaminase producing *Pseudomonas* sp. TR15a and siderophore producing *Bacillus aerophilus* TR15c for enhanced growth and copper accumulation in *Helianthus annuus* L. *Chemosphere*, 276, 130038.

Lindsay, W., Vlek, P. y Chien, S. (1989) Phosphate minerals. *Soil Science Society of America*. Madison, USA. pp 1098-1130.

Lindsay, W. (1979). Chemical equilibria in soils. John Wiley and Sons Ltd. New York USA. 449p.

López M., Soliva M., Huerta O., Codinach E., Lumbreras F. y Pinchi M. (2010). Proceso de compostaje: Caracterización de muestras. *Diputación de Barcelona* ISBN 978-84-9803-428-8. España

López-Gonzalez J.A., Lopez M.J., Vargas-Garcia M.C., Suarez-Estrella F., Jurado M.M. y Moreno J. (2013) Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology*, 146, 573-584.

Malhotra, H., Sharma, S. y Pandey, R. (2018). Phosphorus nutrition: plant growth in response to deficiency and excess. *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance* (pp. 171-190).

Moreno Casco, J. y Moral Herrero, R. (2008). Compostaje. Mundi-Prensa Libros.

Moreno, J. y Mormeneo, S. (2008). Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno J., Moral R. (Eds.), Compostaje. *Mundi-Prensa*. Madrid, España.

Mpanga, I., Ludewig, U., Dapaah, H. y Neumann, G. (2020). Acquisition of rock phosphate by combined application of ammonium fertilizers and *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in maize as affected by soil pH. *Journal of Applied Microbiology*, 129(4), 947-957.

Oliveira, C., Alves, V., Marriel, I., Gomes, E., Scotti, M., Carneiro, N., Guimarães, C., Schaffert, R. y Sá, N. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1782-1787.

Pardo, P., Rauret, G. y López-Sánchez, J. F. (2004). Shortened screening method for phosphorus fractionation in sediments: a complementary approach to the standards, measurements and testing harmonised protocol. *Analytica Chimica Acta*, 508(2), 201-206

Paredes-Mendoza, M. y Espinosa-Victoria, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 61-70.

Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.

Pimentel, D. (2006). Soil erosion: A food and environmental threat. *Environment, Development and Sustainability*, 8(1), 119-137.

Plazas Ariza, E., Bonilla, R. y Pedroza, A. (2018). Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras. (Tesis: Pontificia Universidad Javeriana)

Qarni, A., Billah, M., Hussain, K., Shah, S., Ahmed, W., Alam, S. y Khan, N. (2021). Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Rock Phosphate Mines and their Potential Effect for Sustainable Agriculture. *Sustainability*, 13(4), 2151.

Raymond, N., Gómez-Muñoz, B., van der Bom, F., Nybroe, O., Jensen, L., Müller-Stöver, D. y Richardson, A. (2021). Phosphate-solubilising microorganisms for improved crop productivity: a critical assessment. *New Phytologist*, 229(3), 1268-1277.

Ramírez, L. C. C., Galvez, Z. Y. A. y Burbano, V. E. M. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21).

Rana, K. L., Kour, D., Sheikh, I., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, V. y Saxena, A. K. (2019). Biodiversity of endophytic fungi from diverse niches and their biotechnological applications. *Advances in Endophytic Fungal Research*, 105-144.

Richardson, A. (2007). Making microorganisms mobilize soil phosphorus. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization* (pp. 85-90). Springer, Dordrecht.

Richardson, A., Lynch, J. P., Ryan, P., Delhaize, E., Smith, F., Smith, S., Harvey, P., Veneklaas, E., Lambers, H., Oberson, A., Culvenor, R. y Simpson, R. (2011). Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil*, 349(1), 121-156.

Ruban, V., Lopez-Sanchez, J.F., Pardo, P., Rauret, G., Muntau, H. y Quevauviller. (2001). Development of a harmonized phosphorus extraction procedure and certification of a sediment reference material. *Journal of Environmental Monitoring*, 3, 121-125.

Rubio, P., Godoy, M., Della Mónica, I., Pettinari, M., Godeas, A. y Scervino, J. (2016). Carbon and nitrogen sources influence tricalcium phosphate solubilization and extracellular phosphatase activity by *Talaromyces flavus*. *Current Microbiology*, 72(1), 41-47.

Saeid, A., Prochownik, E. y Dobrowolska-Iwanek, J. (2018). Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. *Molecules*, 23(11), 2897.

Sánchez, Ó., Ospina, D. y Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*, 69, 136-153

Scervino, J., Mesa, M., Della Mónica, I., Recchi, M., Moreno, N. y Godeas, A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and Fertility of Soils*, 46(7), 755-763.

Soumare, A., Diéhiou, A., Arora, N., Tawfeeq Al-Ani, L., Ngom, M., Fall y S., Hafidi, M., Ouhdouch Y., Kouisni, L. y Sy M., (2021). Potential role and utilization of plant growth promoting microbes in plant tissue culture. *Frontiers in Microbiology*, 12, 615.

Symeonakis, E., Karathanasis, N., Koukoulas, S. y Panagopoulos, G. (2016). Monitoring sensitivity to land degradation and desertification with the environmentally sensitive area index: The case of Ilesvos island. *Land Degradation & Development*, 27(6), 1562-1573.

Tsai, S. y Rossetto, R. (1992). Transformações microbianas do fósforo. In *Microbiologia do solo. Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo*. Brasil.

Tapia-Torres, Y. y García-Oliva, F. (2013). Phosphorus availability is a product of soil bacterial activity in oligotrophic ecosystems: a critical review. *Terra Latinoamericana*, 31(3), 231-242.

Torres, C. y Millán, Y. (2015). Caracterización del lixiviado agroecológico a partir de residuos orgánicos de cultivos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(2), 169-182.

Verma, M., Mishra, J. y Arora, N. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria: diversity and applications. *Environmental biotechnology: For sustainable future*, 129–173.

Walker, T. y Syers, J. (1976). The fate of phosphorus during pedogenesis. *Geoderma*, 15(1), 1-19.

Wei, Y., Zhao, Y., Xi, B., Wei, Z., Li, X. y Cao, Z. (2015). Changes in phosphorus fractions during organic wastes composting from different sources. *Bioresource Technology*, 189, 349-356.

Wissuwa, M. (2003). How do plants achieve tolerance to phosphorus deficiency? Small causes with big effects. *Plant Physiology*, 133(4), 1947-1958.

Wyciskiewicz, M., Saeid, A. y Chojnacka, K. (2017). In situ solubilization of phosphorus-bearing raw materials by *Bacillus megaterium*. *Engineering in Life Sciences*, 17(7), 749-758.

Xiao, C., Chi, R., Li, X., Xia, M. y Xia, Z. (2011). Biosolubilization of rock phosphate by three stress-tolerant fungal strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(2), 719-727.

Xu, J., Jiang, Z., Li, M. y Li, Q. (2019). A compost-derived thermophilic microbial consortium enhances the humification process and alters the microbial diversity during composting. *Journal of Environmental Management*, 243, 240-249.

Xu, Y., Hu, H., Liu, J., Luo, J., Qian, G. y Wang, A. (2015). pH dependent phosphorus release from waste activated sludge: contributions of phosphorus speciation. *Chemical Engineering Journal*, 267, 260-265.