

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Bacillus subtilis* EN EL *pH*, ALUMINIO INTERCAMBIABLE, DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO Y ESTABILIDAD DE AGREGADOS, EN UN ULTISOL**

**ARIANIS IBETH SANTOS NICOLELLA**  
**4-773-1713**

**DAVID, CHIRIQUÍ**  
**REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2018**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Bacillus subtilis* EN EL pH, ALUMINIO INTERCAMBIABLE, DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO Y ESTABILIDAD DE AGREGADOS, EN UN ULTISOL**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERÍA EN MANEJO DE CUENCAS Y AMBIENTE**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA**

**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**APROBADO:**

**PROF. ALEXIS SAMUDIO**

\_\_\_\_\_  
**DIRECTOR**

**PROF. AMILCAR BEITIA**

\_\_\_\_\_  
**ASESOR**

**PROF. JOSÉ BINNS**

\_\_\_\_\_  
**ASESOR**

**DAVID, CHIRIQUÍ  
REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2018**

## AGRADECIMIENTO

*A Dios, por poner en mi corazón el deseo de servir a su creación, quien ha estado en cada momento de mi vida, mi más grande guía y quien me ha dado la fortaleza y perseverancia para cumplir cada una de mis metas.*

*A mis padres, Amílcar Santos y Vielka Nicoletta, por enseñarme el valor de la responsabilidad y dar lo mejor de mí en todo lo que haga e inculcarme el valor que tiene la educación.*

*A mi hermana Daneth Santos quien ha sido para mí un ejemplo de perseverancia, creatividad, dedicación y superación.*

*Agradezco de todo corazón al director de mi tesis, el Ing. Alexis Samudio, por guiarme, compartir sus conocimientos, tiempo y dedicación durante todo el proceso de esta investigación y quien sin duda, me ha enseñado a confiar en mis capacidades.*

*Al Lic. Bernardo Balestrini de Alboraya Corp. por haber facilitado la cepa bacteriana de *Bacillus subtilis* M4 y colaborado para el desarrollo de esta investigación.*

*A la Ing. Ana María Villarreal, por su colaboración en el laboratorio de suelos.*

*Al Dr. José Binns por su contribución en la consolidación de esta investigación.*

*A todas aquellas personas que brindaron de su tiempo y apoyo para que esta investigación se llevara a cabo y culminar mis estudios, entre ellos, mi tía Daira Mejía y mis tíos Maxel Gaitán y Marcel Gaitán. A Javier Serracín, a mis compañeras incondicionales Enelysdieth Sánchez y Karen*

*Miranda, Gabriel Castillo, Edwin Guillen, Ciro Guerra, Jesús Pérez, Carlos Rodríguez, Jonathan González, Rodny Chavarría, Kathery Chávez, a los Ingenieros Arnold Troncoso y Joseph Grajales.*

*Agradezco a la Ingeniera Luz Loría por su orientación durante mi carrera universitaria.*

*Agradezco al Ing. Omar Montero, al Sr. Anel. Sanjur y al personal del cuarto frío de la Facultad*

*de Ciencias Agropecuarias por su colaboración.*

*Así que no temas, porque yo estoy contigo;*

*no te angusties, porque yo soy tu Dios.*

*Te fortaleceré y te ayudaré;*

*te sostendré con mi diestra victoriosa.*

*Isaías 41:10*

## **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Bacillus subtilis* EN EL pH, ALUMINIO INTERCAMBIABLE, DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO Y ESTABILIDAD DE AGREGADOS, EN UN ULTISOL.**

**Santos Nicoletta, A.I. 2018.** Evaluación del efecto de la inoculación de *Bacillus subtilis* en el pH, aluminio intercambiable, disponibilidad de fósforo y estabilidad de agregados, en un ultisol. Tesis Ing. Manejo de Cuencas y Ambiente. Chiriquí, Panamá. Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 96 p.

### **RESUMEN**

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los cambios en el pH, aluminio intercambiable, fósforo, estabilidad de agregados de un ultisol por efectos de la inoculación con *Bacillus subtilis* y determinar la producción de materia seca. El estudio se llevó a cabo durante 120 días haciendo muestreos destructivos cada 30 días, en el invernadero del departamento de Suelos y Aguas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá, en el corregimiento de Chiriquí, distrito de David. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial, en el cual se emplearon cinco tratamientos con planta de frijol *Vigna sinensis* y cinco tratamientos sin plantas: testigo (T1),  $1 \times 10^6$  (T2),  $1 \times 10^7$  (T3),  $1 \times 10^8$  (T4) y  $1 \times 10^9$  (T5) unidades formadoras de colonias. No hubo efectos significativos ( $p > 0.05$ ) por parte de los tratamientos en ninguna de las variables. El tiempo de muestreo, presentó diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) en todas las variables siendo a los 30 días donde se observaron los efectos más relevantes; el pH se incrementó a 5.34 y la concentración de aluminio intercambiable disminuyó a  $0.0018 \text{ cmol}_{(+)}/\text{kg}$  de suelo con respecto a los valores iniciales de 4.46 y  $1.93 \text{ cmol}_{(+)}/\text{kg}$  de suelo respectivamente. La materia seca de *V. sinensis* presentó incrementos a través del tiempo lo que pudiera atribuirse a los cambios ocurridos durante los 30 y 60 días. La concentración de bacterias se incrementó de  $0.5 \times 10^8$  a  $1.75 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias en los primeros 30 días del estudio y luego disminuyó a valores cercanos al inicial. Al comparar los efectos de la presencia o ausencia de plantas se observaron efectos altamente significativos en el pH y la concentración de fósforo disponible; el pH fue mayor en los tratamientos sin planta y las concentraciones de fósforo disponible en el suelo fueron mayores en tratamientos con planta. La estabilidad de agregados disminuyó en la mayoría de los tratamientos y durante todo el estudio con respecto al porcentaje inicial que fue de 94.3 por ciento; sin embargo, los porcentajes se mantuvieron superiores a 80 por ciento lo que equivale a un suelo de muy alta a alta estabilidad de agregados. Se concluye que, la presencia de *B. subtilis* provoca cambios favorables en el pH y la concentración de aluminio intercambiable del suelo; pero a medida que la concentración de bacterias disminuye, los efectos que esta provoca en el suelo también disminuyen.

**PALABRAS CLAVE:** Ultisol, *Bacillus subtilis*, pH, aluminio intercambiable, concentración de bacterias, fósforo, suelo, estabilidad de agregados.

## **EVALUATION OF THE EFFECT OF THE INOCULATION OF *Bacillus subtilis* ON pH, EXCHANGEABLE ALUMINUM, AVAILABILITY OF PHOSPHORUS AND STABILITY OF AGGREGATES, IN AN ULTISOL.**

**Santos Nicolella, A.I. 2018.** Evaluation of the effect of inoculation of *Bacillus subtilis* on pH, exchangeable aluminum, availability of phosphorus and stability of aggregates, in an ultisol. Thesis Ing. Management of Watersheds and Environment. Chiriquí, Panama. University of Panama, Faculty of Agricultural Sciences. 96 p.

### **SUMMARY**

The objective of this study was to evaluate the changes in pH, exchangeable aluminum, phosphorus, stability of aggregates of an ultisol by effects of inoculation with *Bacillus subtilis* and determine the production of dry matter. The study was carried out during 120 days making destructive samplings every 30 days, in the greenhouse of the soil and water department of the Faculty of Agricultural Sciences, University of Panama, in the Chiriquí town, district of David. A completely random design with a factorial arrangement was used, in which five treatments were used with *Vigna sinensis* bean plant and five treatments without plants: control (T1),  $1 \times 10^6$  (T2),  $1 \times 10^7$  (T3),  $1 \times 10^8$  (T4) and  $1 \times 10^9$  (T5) colony forming units. There were no significant effects ( $p > 0.05$ ) by treatments in any of the variables. About the time sampling, it presented highly significant differences ( $p < 0.01$ ) in all the variables being 30 days where the most relevant effects were observed; the pH was increased to 5.34 and the exchangeable aluminum concentration decreased to  $0.0018 \text{ cmol}_{(+)}/\text{kg}$  soil and about to the initial values of 4.46 and  $1.93 \text{ cmol}_{(+)}/\text{kg}$  soil respectively. The dry matter of *V. sinensis* showed increases over the time, it could be due to the changes during the 30 and 60 days. The concentration of bacteria increased from  $0.5 \times 10^8$  to  $1.75 \times 10^8$  colony-forming units in the first 30 days of the study and then decreased to values close to the initial. When comparing the effects of the presence or absence of plants, highly significant effects were observed in the pH and the available phosphorus concentration; the pH was higher in treatments without plants and the concentrations of phosphorus available in the soil were higher in plant treatments. The stability of aggregates decreased in most of the treatments and throughout the study compared to the initial percentage that was 94.3 percent; however, the percentages remained above 80 percent, which is equivalent to a soil from high to higher aggregate stability. It is concluded that the presence of *B. subtilis* causes favorable changes in the pH and the exchangeable aluminum concentration of the soil; but as the concentration of bacteria decreases, the effects that it causes in the soil also decreases.

**KEY WORDS:** Ultisol, *Bacillus subtilis*, pH, exchangeable aluminum, bacteria concentration, phosphorus, soil, stability of aggregates.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTO .....	ii
SUMMARY .....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Antecedentes .....	3
1.3. Justificación.....	6
1.4. Objetivos .....	7
1.4.1. General.....	7
1.4.2. Específicos.....	8
1.5. Hipótesis.....	8
1.6. Alcances y limitaciones .....	9
2. MARCO TEÓRICO .....	11
2.1. Microorganismos eficientes (EM) .....	11
2.2. Biofertilizantes .....	11
2.2.1. <i>Bacillus subtilis</i> .....	13
2.3. Importancia de los nutrientes del suelo para los cultivos.....	15
2.3.1. Fósforo .....	18
2.4. Acidez del suelo .....	23
2.4.1. Acidez activa .....	24
2.4.2. Acidez intercambiable-potencial.....	26
2.5. Estructura y estabilidad de agregados del suelo .....	27
2.5.1. Factores que afectan la estabilidad de los agregados .....	28
2.5.2. Importancia de la estabilidad de agregados.....	31
2.5.3. Clasificación de los agregados.....	31
2.6. Orden de suelo ultisol.....	33
2.6.1. Propiedades químicas.....	34
3. MARCO METODOLÓGICO.....	37
3.1. Ubicación y descripción del área de estudio .....	37
3.2. Metodología.....	38

3.2.1	Recolección de datos en el invernadero .....	38
3.3.	Variables de respuesta evaluadas .....	42
3.3.1.	Estabilidad de agregados .....	42
3.3.2.	pH .....	43
3.3.3.	Disponibilidad de fósforo en el suelo .....	43
3.3.4.	Concentración de aluminio intercambiable .....	43
3.3.5.	Concentración de bacterias .....	43
3.3.6.	Rendimiento de biomasa .....	45
3.4.	Análisis de datos .....	45
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
4.1.	Análisis de las variables de estudio previo a la inoculación del suelo con <i>B. subtilis</i> .....	47
4.2.	Análisis de varianza.....	48
4.3.	Curva de calibración bacteria suelo .....	49
4.4.	Concentración de bacterias presentes en el suelo .....	50
4.5.	Variación del pH del suelo a través de los tiempos de muestreo .....	52
4.6.	Comportamiento de la concentración de aluminio intercambiable en el suelo .....	53
4.7.	Comportamiento de la concentración de fósforo disponible en el suelo ..	55
4.8.	Interacción pH-fósforo- aluminio.....	58
4.9.	Producción de materia seca de <i>Vigna sinensis</i> .....	59
4.10.	Efecto de la presencia o ausencia de plantas .....	60
4.11.	Estabilidad de agregados .....	62
5.	CONCLUSIONES .....	66
6.	RECOMENDACIONES.....	68
7.	REFERENCIAS .....	69
8.	ANEXOS.....	79



## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁG.
I	RESUMEN DE LOS PRINCIPALES PROCESOS INVOLUCRADOS EN LA SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS POR BACTERIAS .....	17
II	ESCALA DE McFARLAND PARA CUATIFICAR LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS POR TURBIDIMETRÍA .....	45
III	DATOS INICIALES DEL SUELO DE ESTUDIO, PREVIOS A LA INOCULACIÓN CON <i>Bacillus subtilis</i> .....	47
IV	ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LOS DATOS DE pH, CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS, CONCENTRACIÓN DE ALUMINIO INTERCAMBIABLE, DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO Y MATERIA SECA DE UN ULTISOL .....	49
V	EFEECTO DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE PLANTAS EN LAS VARIABLES DE RESPUESTA EN UN ULTISOL INOCULADO CON <i>Bacillus subtilis</i> .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁG.
1	Relación de los valores de pH con la disponibilidad de algunos nutrimentos importantes del suelo y la presencia de microorganismos benéficos.....	24
2	Arreglo en bloques completos al azar del estudio en invernadero.....	40
3	Preparación de la solución madre de inculo <i>B. subtilis</i> a $1 \times 10^9$ y dilución a las concentraciones de los tratamientos $1 \times 10^8$ , $1 \times 10^7$ , $1 \times 10^6$ unidades formadoras de colonia.....	41
4	Curva de calibración, bacteria-suelo por la escala de McFarland.	50
5	Comportamiento de la población de <i>B. subtilis</i> en un ultisol inoculado con diferentes concentraciones de bacterias.....	51
6	Variación del pH a través del tiempo de estudio por efectos de la inoculación con diferentes concentraciones de <i>B. subtilis</i> en un ultisol.....	53
7	Variación de la concentración de aluminio intercambiable durante 120 días en un ultisol inoculado con <i>Bacillus subtilis</i> .....	55
8	Variación de la concentración de fósforo disponible durante 120 días en un ultisol inoculado con <i>Bacillus subtilis</i> .....	57
9	Interacción pH-fósforo de un ultisol inoculado con diferentes concentraciones de <i>Bacillus subtilis</i> durante 120 días.....	58
10	<i>Producción de materia seca de Vigna sinensis, en un ultisol inoculado con Bacillus subtilis</i> .....	60

11	Porcentaje de agregados estables de un ultisol con planta, inoculado con <i>Bacillus subtilis</i> en concentraciones $1 \times 10^6$ , $1 \times 10^7$ , $1 \times 10^8$ , $1 \times 10^9$ unidades formadoras de colonia, bajo invernadero durante 120 días.....	63
12	Porcentaje de agregados estables de un ultisol sin planta, inoculado con <i>Bacillus subtilis</i> en concentraciones $1 \times 10^6$ , $1 \times 10^7$ , $1 \times 10^8$ , $1 \times 10^9$ unidades formadoras de colonia, bajo invernadero durante 120 días.....	64

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Planteamiento del problema

En la actualidad, no todos los suelos son cultivables o aptos para producir la cantidad y calidad de alimentos que la humanidad necesita, pues de manera generalizada de acuerdo con Núñez (2001), a nivel mundial solo el 11 por ciento de hectáreas, lo que es aproximadamente 1,500 millones de hectáreas de los suelos del mundo no tienen limitaciones para el desarrollo agrícola.

La necesidad de producir alimento provoca a su vez la necesidad de cultivar en suelos no aptos para la agricultura; el crecimiento poblacional utiliza los terrenos adecuados para la agricultura en ocupaciones de viviendas y desarrollo económico, marginando la producción agrícola y ganadera hacia terrenos no adecuados para este fin.

En América, el 41 por ciento de los suelos son ácidos según Instituto Geográfico Agustín Codazzi, citado por Acosta y Ramírez (2010). En Panamá, de acuerdo con Tejeira (s.f.), la temperatura media anual fluctúa entre los 10 grados Celsius en pequeñas áreas montañosas y 27 grados Celsius en tierras bajas; la precipitación media anual fluctúa entre 1,000 y 7,000 milímetros y varía entre 1,500 y 4,000 milímetros anuales. Condiciones que resultan en altas tasas de meteorización y lixiviación acrecentando la acidez de los suelos, por lo que datos del IDIAP (2006), indican que en el istmo panameño predominan los suelos

ácidos), ocupando un 40 por ciento del territorio junto con los acrisoles (Villarreal *et al.* 2010 y Name y Villarreal 2004).

Por su naturaleza y material parental, los suelos ultisoles son suelos poco fértiles; (Wilding *et al.* citado por Chinchilla *et al.* 2011). Contienen bajo contenido de cationes básicos, por ende, una baja saturación de bases, dando como resultado un suelo ácido, generalmente con altos contenidos de aluminio intercambiable. Además, los procesos de acumulación, descomposición y humificación de la materia orgánica son menores que en otros ordenes de suelos (Gisbert *et al.* s.f.).

Por sus características, estos suelos no son aptos o son poco aptos para la agricultura, o donde no todos los cultivos pueden desarrollarse. Sin embargo, en los últimos 50 años los avances tecnológicos han llevado a un salto cualitativo en la producción de alimentos, impulsando así la seguridad alimentaria mundial (FAO 2015).

Por otro lado, si bien es cierto que los fertilizantes han permitido corregir la fertilidad de los suelos para la agricultura, estos traen un impacto ambiental adverso, como la eutrofización, la contaminación de mantos acuíferos con nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), lluvia ácida y calentamiento global (Armenta *et al.* 2010) o el deterioro de la estructura del suelo y la disminución de la disponibilidad de nutrimentos como el fósforo, boro, zinc y manganeso, por efectos del sobreencalado (Sánchez 1981).

## 1.2. Antecedentes

La tecnología de Microorganismos Eficaces (EM), fue desarrollada por el Doctor Teruo Higa, Ph. D, profesor de la Horticultura de la Universidad Ryukyus en Okinawa, Japón (Gill *et al.* 2005).

Acosta y Ramírez (2010), estudiaron el efecto del *Bacillus subtilis* sobre las propiedades físicas y químicas de un ultisol; en el estudio se evaluó la estabilidad estructural, el incremento en tamaño promedio de agregados, el aluminio, el fósforo y el pH. El estudio se llevó a cabo en macetas con plantas de lechuga y macetas sin planta, aplicando concentraciones de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc) y se analizó el cambio en las propiedades físicas y químicas antes mencionadas a los 30, 60, 90 y 120 días.

Los resultados mostraron un aumento considerable del fósforo disponible en el suelo a los 90 días, en un 550 por ciento con relación a la concentración inicial, que disminuyó por absorción de la planta. El pH, aumentó de 4.7 a 5.0 hasta los 90 días del estudio y luego disminuyó. La concentración de aluminio disminuyó durante todo el experimento, tanto para los tratamientos con planta y sin planta; los tratamientos que presentaron valores de concentración de aluminio intercambiable más bajos fueron el testigo sin planta, sin planta con  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias y con  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias en presencia de planta, todos a los 90 días. Se concluyó que *Bacillus subtilis* mejoró las propiedades físicas del ultisol degradado, y con relación al tamaño de agregados y la estabilidad estructural se encontraron cambios importantes en tiempos relativamente cortos. El diámetro medio ponderado (dmp) presentó un

incremento del 160 por ciento entre los tratamientos testigo sin planta y sin planta con  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias a los 90 días.

Castro *et al.* (2015), evaluaron la acción de *Bacillus subtilis* sobre la estabilidad de agregados y algunas propiedades químicas del suelo. En el estudio se implementó un sistema de rotación soya-tomate, con incorporación de biomasa verde y aplicación de inóculos microbianos individuales y en mezcla sobre el crecimiento de las plantas y propiedades edáficas; para ello se evaluaron en invernadero por 24 meses los siguientes tratamientos: solo tomate; rotación tomate-soya; rotación tomate-soya con inoculaciones individuales de *Azospirillum oryzae*; de *Pseudomonas fluorescens*; de *Bacillus subtilis*; de microorganismos de montaña; y las inoculaciones en mezcla de *B. subtilis* y *P. fluorescens*; de *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *A. oryzae*; de *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *Azospirillum sp.* y Microorganismos de Montaña. Dentro de las variables físicas se analizó la estabilidad de agregados y dentro las variables químicas, el pH y contenido de nutrimentos en suelos y foliares. De las propiedades biológicas se analizaron entre otras, el peso fresco y seco de biomasa aérea. No hubo alteración de la estabilidad de agregados por parte de ninguno de los tratamientos, no obstante, al evaluar el pH en el primer ciclo de soya se observó una tendencia al incremento del pH en los tratamientos, excepto en los tratamientos a los que se aplicaron Microorganismos de Montaña, donde el pH fue significativamente menor. En el segundo ciclo de Soya, el pH aumentó significativamente en todos los tratamientos respecto a la evaluación inicial, la cual fue 5.5. Los contenidos de calcio (C) y nitrógeno (N), el mayor incremento comparado al contenido inicial, se

presentó en el tratamiento de mayor complejidad microbiana y fue de alrededor del 100 por ciento para ambos elementos. Respecto al contenido de fósforo, los únicos tratamientos que no presentaron síntomas visibles de deficiencia fueron aquellos a los cuales se les aplicó Microorganismos de Montaña. Respecto a la producción de biomasa tanto para soya y tomate, la inoculación con *Azospirillum oryzae*; con *B. subtilis* y *P. fluorescens*; *B. subtilis*, *P. fluorescens* y *A. oryzae*, logró aumentar la biomasa evaluada como peso fresco foliar (PFF) acumulado. Sin embargo, los tratamientos con adición de microorganismos de montaña obtuvieron la mayor producción de biomasa (alrededor de 179 por ciento para tomate y 64 por ciento para soya).

Cardona *et al.* (2016), analizaron el efecto de la fertilización química y orgánica sobre la estabilidad estructural de un suelo cultivado con bananito (*Musa acuminata* AA). En la investigación, se emplearon ocho tratamientos; que incluían compost, micorrizas, fertilizantes minerales, fertilizante 17 – 6 – 18 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) (60 y 100 gramos) y un testigo absoluto (sin fertilización). Los valores más altos de diámetro medio ponderado (dmp), se obtuvieron con uso de solo compost y mezclado con micorrizas (0.67 y 0.65 milímetros respectivamente); a diferencia de los suelos que recibieron fertilización mineral y química, que presentaron mala estructuración con diámetros inferiores a 0.5 milímetros (<0.5mm). Para la estabilidad estructural (EA), suelos que recibieron fertilización completa, compost mezclado con micorrizas y 60 gramos de 17– 6 – 18; presentaron una estabilidad estructural alta, clase tres (20.1 a 30 por ciento); en contraste de los suelos que



recibieron los demás tratamientos con una estabilidad media, clase dos (10.1 a 20 por ciento).

Cisneros *et al.* (2017), evaluaron el efecto de *Kocuria sp.* y *Bacillus subtilis* como bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF), sobre el desarrollo de plántulas de café en la variedad Castillo. Los tratamientos se establecieron bajo tres tipos de sustratos para las plántulas: suelo-pulpa de café sin microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF), con *Kocuria sp.*, con *Bacillus subtilis*, con *Kocuria sp.* y *Bacillus subtilis* (tratamientos del uno al cuatro respectivamente); suelo-pulpa de café-Roca fosfórica (RF) (26P, 40 partes por millón) sin microorganismos solubilizadores de fósforo, con *Kocuria sp.*, con *Bacillus subtilis*, con *Kocuria sp.* y *Bacillus subtilis* (tratamientos del cinco al ocho respectivamente); suelo-fosfato diamónico (DAP) (dos gramos por planta) sin microorganismos solubilizadores de fósforo (tratamiento nueve). Los tratamientos sin roca fosfórica inoculados individualmente con las bacterias *Kocuria sp.* y *Bacillus subtilis*, presentaron los valores más altos en materia orgánica (MO), pH y fósforo (P), con respecto a los demás tratamientos.

### **1.3. Justificación**

El suelo es la base para la agricultura y el medio donde crecen casi todas las plantas que el hombre obtiene para su alimentación; de tal manera se estima, que el 95 por ciento de los alimentos que se consumen a nivel mundial se obtienen directa o indirectamente de los suelos (FAO 2015).

Es necesario, asegurar no solo la producción de alimentos de manera sostenible y respetuosa con el ambiente, sino también para mantener otros servicios ambientales necesarios para la vida.

Por este motivo nacen los biofertilizantes; preparados de microorganismos aplicados al suelo y/o planta. Dentro de los cuales existen dos grupos, aquellos microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias promotoras del crecimiento de las plantas y aquellos que son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro de microorganismos patógenos (Bashan y Holguin; Lucy *et al.* citados por Armenta *et al.* 2010).

Entre los microorganismos utilizados como biofertilizantes se encuentra *Bacillus subtilis*, el cual pertenece a los dos grupos antes mencionados y que además de favorecer según Bach y Díaz (2008), la disponibilidad del fósforo por parte de las plantas, es capaz de incrementar el pH de los suelos ácidos (Acosta y Ramírez 2010).

La presente investigación busca identificar en el *Bacillus subtilis* una alternativa potencial a los fertilizantes sintéticos, para la corrección de la fertilidad de los suelos ácidos y poco fértiles en un marco biológico y sostenible que no afecte el medio ambiente.

#### **1.4. Objetivos**

##### **1.4.1. General**

Evaluar el efecto de la inoculación de *Bacillus subtilis* en la estabilidad de agregados, el pH, aluminio y disponibilidad del fósforo en un ultisol.

### 1.4.2. Específicos

- Determinar los cambios en el pH, la concentración de aluminio y disponibilidad del fósforo en un ultisol.
- Analizar los efectos de la inoculación de *B. subtilis* en la estabilidad de agregados del suelo.
- Comparar la acción de las diferentes concentraciones de *Bacillus subtilis* sobre las características físicas y químicas del suelo.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de *Bacillus subtilis* en la producción de biomasa de frijol *Vigna sinensis. L.*

### 1.5. Hipótesis

#### Hipótesis de Investigación

**Hi:** La bacteria *Bacillus subtilis* promueve cambios en las características químicas como el pH, la concentración de aluminio y disponibilidad del fósforo en el suelo de orden ultisol así como en la estabilidad de agregados del mismo.

#### Hipótesis Nula

**H<sub>0</sub>:** La bacteria *Bacillus subtilis* no promueve cambios en las características químicas como el pH, la concentración de aluminio y disponibilidad del fósforo en el suelo de orden ultisol así como en la estabilidad de agregados del mismo.

## 1.6. Alcances y limitaciones

### Alcances

Esta investigación identificará el efecto de los microorganismos eficientes sobre las propiedades físicas y químicas del suelo, permitiendo así brindar información científica que sustente el potencial o no, de estos microorganismos para mejorar las propiedades del suelo e incrementar la eficiencia de la aplicación de fertilizantes.

Igualmente, la información resultante puede ser utilizada como base para considerar la implementación de sistemas agrícolas en suelos ácidos de baja fertilidad (ultisoles), con cultivos que generalmente son establecidos en suelos de mediana o alta fertilidad. Debido a que se indica que el microorganismo estudiado; *Bacillus subtilis*, libera o mejora la disponibilidad de fósforo para el desarrollo de los cultivos.

### Limitaciones

La principal limitante para llevar a cabo esta investigación fue la disponibilidad de equipos de alta tecnología, que permitieran analizar las muestras de una manera fácil y rápida; lo que, conllevó a la adaptación de métodos de análisis a las condiciones del laboratorio. Por ejemplo, la determinación de la población bacteriana y el equipo para evaluar la estabilidad de agregados.

Otra condición adversa, fue la disponibilidad de un invernadero con una instalación lo suficientemente adecuada, que permitiera trabajar a todas horas del

día y con un debido control biológico, para evitar el acceso de plagas dañinas para las plantas del estudio.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Microorganismos eficientes (EM)**

Los microorganismos eficientes (EM), son una mezcla de diferentes tipos de microorganismos benéficos, que poseen propiedades de fermentación, producción de sustancias bioactivas, competencia y antagonismo con patógenos, lo que ayuda a mantener un equilibrio natural entre los microorganismos que conviven en el entorno, proporcionando efectos positivos sobre salud y bienestar (Gill *et al.* 2005).

### **2.2. Biofertilizantes**

Los biofertilizantes son preparados de microorganismos aplicados al suelo y o las plantas, con el fin de sustituir las aplicaciones de fertilizantes sintéticos y disminuir la contaminación ambiental que estos provocan (Armenta *et al.* 2010).

Dentro de los biofertilizantes, se encuentran los microorganismos que intervienen en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBNA), los que proporcionan fósforo a las plantas influenciada por los microorganismos de la rizósfera o rizobacterias. También se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento (BPCP) y los microorganismos productores de sideróforos.

Estos últimos son microorganismos, que bajo condiciones de baja disponibilidad de nutrientes (hierro, fósforo y calcio) producen sustancias que alteran la disponibilidad de elementos por medio de la acción de quelatos orgánicos llamados sideróforos, que forman complejos extremadamente estables (Wittenberg, citado por Samudio 1997).

Samudio (1997), expone que el sideróforo es un quelatizante orgánico específico para hierro, producido por algunos hongos y bacterias de género *Pseudomonas* y otras rizobacterias. Existe un tipo especial de sideróforos, el hidroxamate, que presente en la rizósfera, podría efectivamente aumentar el nivel de hierro al solubilizar fosfatos de hierro a pH ácidos; al ser tomado el hierro por el siderofo, el fósforo quedará disponible para ser absorbido por las plantas y microorganismos del suelo.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento son: *“Las bacterias de vida libre, encontradas en la rizosfera de las plantas como Rizobacterias Promotora del Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés, que viene de la denominación Plant Growth Promoting Rhizobacteria) éstas demostraron ser organismos altamente eficientes para aumentar el crecimiento de las plantas e incrementar sus defensas frente a otros microorganismos causantes de enfermedades”* (Kloepper, citado por Bach y Díaz 2008).

Otra definición la presenta Puente *et al.* (2010), que define a los microorganismos promotores del crecimiento simplemente como microorganismos habitantes de la rizósfera que estimulan significativamente el crecimiento de las plantas. En este

caso las siglas se identifican como PGPM (Plant Growth-Promoting Microorganism) por sus siglas en inglés.

### **2.2.1. *Bacillus subtilis***

El *Bacillus subtilis* se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva con forma bacilar, aerobias estrictas o anaerobias facultativas, que en condiciones de estrés forman una endoespora central, que deforma la estructura de la célula (Venner y Martin 2009). Resisten a factores físicos como la temperatura, la desecación, la radiación, los ácidos y desinfectantes químicos. Pueden llegar a vivir dentro de los límites de temperatura de 55 a 70 grados Celsius y soportar pH de hasta dos a tres (Lisboa, citado por Gonzáles 2012).

- **Taxonomía**

Reino: Bacteria

Filo: *Firmicutes*

Clase: *Bacilli*

Orden: *Bacillales*

Familia: *Bacillaceae*

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus subtilis*

- **Mecanismo de acción**

El género *Bacillus* puede actuar de dos formas en la promoción del crecimiento vegetal. La primera de ellas es de manera directa, las bacterias tienen la



capacidad de llevar cabo la fijación biológica del nitrógeno, solubilizar minerales como el fósforo y producir hormonas reguladoras del crecimiento vegetal (Tejera *et al.* 2011), en este último caso fitoreguladores como auxinas y citocininas (González 2012). De forma indirecta, estas actúan a través de sustancias antagonicas a patógenos o la inducción del fortalecimiento vegetal.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, también son capaces de producir sustancias fisiológicamente activas como vitaminas, citoquininas, ácido-indol-acético, las cuales mediante acción conjunta estimulan la germinación de las semillas, acelera el desarrollo de las plantas e incrementa el rendimiento de los cultivos (González 2012).

El género *Bacillus* tiene la capacidad de solubilizar el fósforo que se encuentra inmovilizado e inaccesible para las plantas. *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis* son los más estudiados por poseer esta capacidad debido a que según Tejera *et al.* (2011), estos excretan al medio ácidos orgánicos como principal mecanismo de solubilización.

Inclusive se ha documentado por Usha *et al.* citados por Corrales *et al.* (2014), que *Bacillus subtilis* es capaz de solubilizar otras formas de fosfatos, como fosfato de roca (RP), fosfato tricálcico (TCP) y fosfato de hidrógeno de potasio (KHP).

*Bacillus subtilis* presenta otras bondades como fortalecedor de suelo; al poner la bacteria en el medio, genera carbonatos de calcio o cal, sustancias que fortalecen el suelo. Este proceso, bautizado como “encalamiento biológico”, logra aumentar

los agregados en la tierra y sus nutrimentos, y disminuir la presencia de componentes tóxicos como el aluminio (Cañas s.f.).

*Bacillus subtilis*, produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos y ácidos nucleicos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones. También producen antibióticos como la bacitracina, polimixina, gramicidina y circulina, además fermentan la caseína y el almidón (Calderón *et al.* citados por Cuervo 2010).

Las bacterias transforman los fosfatos insolubles a formas solubles por la acción de diferentes mecanismos directos o indirectos. Entre ellos, la acción de ácidos orgánicos producidos por microorganismos, quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes y asimilación directa de fosfatos insolubles por microorganismos que lo acumulan en sus células y los liberan posteriormente (Restrepo *et al.* citados por Llanos 2017) (Cuadro I).

### **2.3. Importancia de los nutrimentos del suelo para los cultivos**

Se considera la existencia de 16 elementos esenciales para las plantas, estos son: carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno, fósforo, calcio, azufre, potasio, magnesio, hierro, boro, manganeso, cobre, zinc, molibdeno y cloro (Arévalo y Castellano 2009).

Existen diferentes factores que intervienen o afectan la disponibilidad de los nutrimentos en el suelo. Dentro de ellos está la humedad, que a su ausencia los nutrimentos no se solubilizan y las plantas no pueden absorberlos. Otro factor es la aireación, ya que sin oxígeno las plantas no pueden crecer ni absorber

nutrimentos suficientes. Por último se encuentra el pH, que influye en la disponibilidad de todos los nutrimentos.

De acuerdo con Arévalo y Castellano (2009), el pH promedio para la absorción óptima de todos los nutrimentos está entre 5.7 y 6.5. Sin embargo, la acidez peligrosa para la agricultura es la asociada a elevadas concentraciones de aluminio intercambiable que no solo interfiere en la absorción de nutrimentos, sino que reduce el crecimiento de las raíces de las plantas.

Según el autor anteriormente citado, existen cuatro formas comunes en que se presentan los nutrimentos en el suelo. La primera de ellas es la estructural, donde los nutrimentos forman parte del material mineral, como rocas, minerales primarios o secundarios o de la estructura molecular del material orgánico no descompuesto, de esta forma el nutrimento no está disponible para las plantas, ya que estas no pueden absorberlo; la segunda forma es la intercambiable, donde los nutrimentos se encuentran adheridos a las moléculas orgánicas del suelo o a las arcillas, permaneciendo en equilibrio con la solución del suelo, de manera muy dinámica.

La tercera y cuarta forma en que se presentan los nutrimentos en el suelo, son en la solución y fijado. Los nutrimentos en solución son aquellos que se encuentran disueltos en el agua del suelo, en equilibrio con la forma intercambiable y estos pueden ser absorbidos por las raíces. Aquellos nutrimentos fijados, son los que ya estuvieron solubles y disponibles por algún tiempo y volvieron a ser parte de la estructura de ciertos minerales arcillosos (principalmente óxidos de hierro y aluminio); como tal, no están disponibles para las plantas.

**CUADRO I. RESUMEN DE LOS PRINCIPALES PROCESOS INVOLUCRADOS EN LA SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS POR BACTERIAS.**

<b>Proceso</b>	<b>Algunas causa de disolución mineral</b>	<b>Principal reacción que lleva a la disolución mineral</b>	<b>Aplicabilidad a fosfatos minerales</b>
Acidificación del medio	Liberación de protones o producción de ácidos inorgánicos fácilmente disociables	Disminución del pH del medio, formación de hidrofosfatos de mayor solubilidad	Fosfato de calcio
Formación de complejos metálicos	Liberación de ácidos orgánicos o complejos (quelantes)	Formación de complejos metálicos (incluyendo quelatos en el caso de ácidos di-tricarboxílicos y hidrocarboxílicos)	Fosfato de calcio, $Al^{3+}$ y $Fe^{3+}$
Reducción de metales	Actividades redox de bacterias o sus exudados (metabolitos secundarios)	Reducción de metales con estados de oxidación variable (ligados a fosfatos) a un bajo estado de oxidación (resultando en un fosfato más soluble)	Fosfato de hierro
Disolución de fosfatos mediada por enzimas	Liberación extracelular de enzimas específicas como fosfatasas	Hidrolisis enzimática de esterres de fosfato orgánicos pobremente solubles liberando fosfatos inorgánicos	Varios esterres de fosfatos orgánicos (fitatos, fosfolípidos)
Disolución indirecta de fosfatos	Estimulación microbiana de exudación de ácidos orgánicos a la planta	formación de complejos metálicos por liberación de la interacción planta-microorganismo	Fosfatos de calcio, $Al^{3+}$ y $Fe^{3+}$

(Restrepo *et al.* citados por Llanos 2017).

### **2.3.1. Fósforo**

- **Ciclo del fósforo**

El fósforo se considera un elemento de ciclo cerrado, porque sus mayores depósitos o reservorios, se encuentran en forma de rocas fosfóricas. Este elemento proviene de las apatitas y depósitos de fosfato natural o rocas fosfóricas donde para ser liberado, requiere de procesos de meteorización, lixiviación, erosión y extracción industrial como fertilizante (Cerón y Aristizábal 2012).

La acción de microorganismos solubilizadores de fosfato inorgánico, libera fósforo a la solución soluble del suelo; donde muchos microorganismos y plantas lo absorben e integran a sus estructuras biológicas, pues al morir, la materia orgánica de cualquier organismo se convierte en un reservorio de fósforo que, mediante la acción de enzimas fosfatasas microbianas, es liberado nuevamente a la solución del suelo (Morales, citado por Llanos 2017).

- **Disponibilidad y formas de fósforo**

La movilidad del fósforo en el suelo es limitada y tan solo el 0.1 y 0.4 por ciento del fósforo natural está disponible (Corrales *et al.* 2014), según Morón (1999), las concentraciones de fósforo en la solución del suelo son generalmente muy bajas. Considerando una hectárea y 20 centímetros de profundidad de capa arable, con el 25 por ciento del volumen ocupado por agua y para una concentración de 0.05 microgramos de fósforo por mililitros ( $\mu\text{g}$  de P/ml) en la solución del suelo, la cantidad de fósforo presente en solución sería de 25 gramos de fósforo por hectárea.

Según Negrín, citado por Morales (2016), la clasificación más simple de las formas de fósforo en el suelo, se presentan por la fracción total de fósforo, que a su vez se subdivide en la fracción inorgánica y la fracción orgánica.

El fósforo inorgánico se encuentra combinado con aluminio (Al), hierro (Fe), calcio (Ca) y minerales arcillosos. La fracción de fósforo ligada al aluminio ha sido considerada como la más importante para la nutrición de las plantas en suelos ácidos o cercanos a la neutralidad (Kamprath & Watson; Morón & Khier, citados por Morón 1999).

El fósforo orgánico, forma parte de la materia orgánica del suelo y tiende a seguir el esquema de acumulación o pérdida de la misma (Stevenson, citado por Morón 1999). La constituyen residuos de plantas, animales y microorganismos, que liberan compuestos como, fosfolípidos, ésteres y ácidos nucleicos, lo que representa entre un 30 y un 60 por ciento del fósforo total. La mineralización de éstos, retornándolos a fosfatos inorgánicos (Pi), permite el reciclaje del elemento para que regrese a la biota (Cerón y Aristizábal 2012).

En el trópico, los contenidos de fósforo total tienen una variación de 18 miligramos de fósforo por kilogramo de suelo en oxisoles y ultisoles hasta 3,300 miligramos de fósforo por kilogramo de suelo (Macedo, citado por Morales 2016).

Por su parte, González, citado por Morales (2016), indica que en los suelos oxisoles, ultisoles y alfisoles presentan valores de fósforo total inferiores a 200 partes por millón, a diferencia de los andisoles, que presentan valores entre 1,000 y 3,000 partes por millón de fósforo total en el suelo.

Según Osorio, citado por Cuervo (2010), la disponibilidad del fósforo está controlada por la mineralización e inmovilización a través de la fracción orgánica, la solubilización y precipitación de fosfato a formas orgánicas. La mineralización es un proceso enzimático, en donde el grupo de enzimas fosfatas catalizan una variedad de reacciones que liberan fosfatos de compuestos orgánicos hacia la solución del suelo, estas fosfatasas son liberadas por microorganismos extracelularmente.

Los minerales arcillosos e hidróxidos amorfos son otros de los factores que afectan la disponibilidad del fósforo. En el caso de la mineralogía de las arcillas, estas afectan la retención de fosfatos, debido a que el contenido de arcilla de los suelos determina la cantidad de fósforo que puede ser fijado (Samudio 1994).

Según el autor antes citado, en suelos oxisoles y ultisoles la retención de fósforo generalmente aumenta a medida que se incrementa el contenido de arcilla; la relación directa con el área superficial en donde están localizados los óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio, son los responsables en gran parte de la retención de fosfatos. Al incrementarse los minerales cristalinos en las arcillas, la retención de fósforo disminuye de forma antagónica.

- **Importancia para las plantas y el suelo**

El fósforo, apoya al almacenamiento de energía obtenida a partir de la fotosíntesis y del metabolismo de carbohidratos en forma de polifosfatos, los cuales son usados para el crecimiento y la reproducción vegetal (Prada, citado por Llanos 2017).

El fósforo desempeña un papel importante en la fotosíntesis, la respiración, el almacenamiento y transferencia de energía, la división y crecimiento celular y otros procesos que se llevan a cabo en la planta. Además, promueve la rápida formación y crecimiento de las raíces; mejora la calidad de la fruta, hortalizas y granos y es además vital para la formación de la semilla. El fósforo, está involucrado en la transferencia de características hereditarias de una generación a la siguiente (Munera y Meza s.f.).

El fósforo interviene en la formación de azúcares de cinco carbonos (ciclo de las pentosas), como consecuencia, cuando hay falta de este elemento los carbonos utilizados en este ciclo no pueden formar azúcares. Estos carbonos son desviados a la formación excesiva de antocianinas lo que se observa fenotípicamente por un cambio gradual en la coloración del follaje empezando desde un verde oscuro en las hojas jóvenes a un púrpura en las hojas mayores, como respuesta de la acumulación de dichos compuestos (White *et al.* citados por Llanos 2017).

Arias, citada por Morales (2016), describe que el fósforo adsorbido por las células de las plantas se involucra rápidamente en el proceso del metabolismo, pues este elemento es móvil en la planta, donde es traslocado principalmente por el floema. Dentro de la planta, el fósforo forma parte de la molécula de adeninatrifosfato (ATP), fuente de energía que participa en todos los procesos metabólicos; forma parte de la cadena estructural del ácido ribonucleico (RNA) el cual participa en la síntesis de la proteína y del ácido desoxirribonucleico (DNA) que es un transportador genético.



La mayor parte del fósforo es absorbido por las plantas en forma de  $\text{PO}_4\text{H}^2$  y en menor proporción como  $\text{PO}_4\text{H}^-2$ . De hecho, la absorción del primero es diez veces más rápida que el segundo. Debe tomarse en cuenta que en este proceso el pH del suelo influye notablemente (Navarro y Navarro, citados por Llanos 2017).

- **Interacción con otros nutrientes**

La transformación de los fosfatos de un compuesto a otro está controlada principalmente por el pH. A medida que los suelos se tornan ácidos, las actividades del hierro y el aluminio aumentan y los fosfatos de calcio relativamente solubles, se convierten en compuestos de hierro y aluminio menos solubles (Munera y Meza s.f.).

En este contexto el pH influye en la solubilización de los hidróxidos de hierro y aluminio. A un valor de pH por debajo de 6.5 se precipitan los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{Al}^{3+}$  generándose como productos fosfatos amorfos de hierro y aluminio, así mismo a un valor de pH entre 7.5 y 8.5 se pueden formar sales sódicas de fosfato, las cuales aunque son más solubles en agua, tampoco son asimiladas por las plantas, cuando hay altas concentraciones de calcio. A valores de pH mayores de 7.5, la concentración de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  es muy baja y el ión  $\text{HPO}_4^-$  precipita por acción del calcio formando fosfato dicálcico, el cual es relativamente insoluble en agua, sin embargo, estos precipitados amorfos son moderadamente disponibles para las plantas (Prada, citado por Llanos 2017).

Según Fernández (2007), en suelos ácidos se produce la precipitación de fosfatos de aluminio, altamente insolubles, lo que conduce a concentraciones muy bajas

de fosfatos en el suelo. La presencia de hidróxidos de aluminio en suelos, favorece la retención de fósforo en su superficie, disminuyendo su disponibilidad.

Por otro lado, según Anzuay *et al.* citados por Llanos (2017), el fósforo en el suelo sufre varias reacciones con iones de calcio, aluminio o hierro lo que provoca su precipitación o fijación.

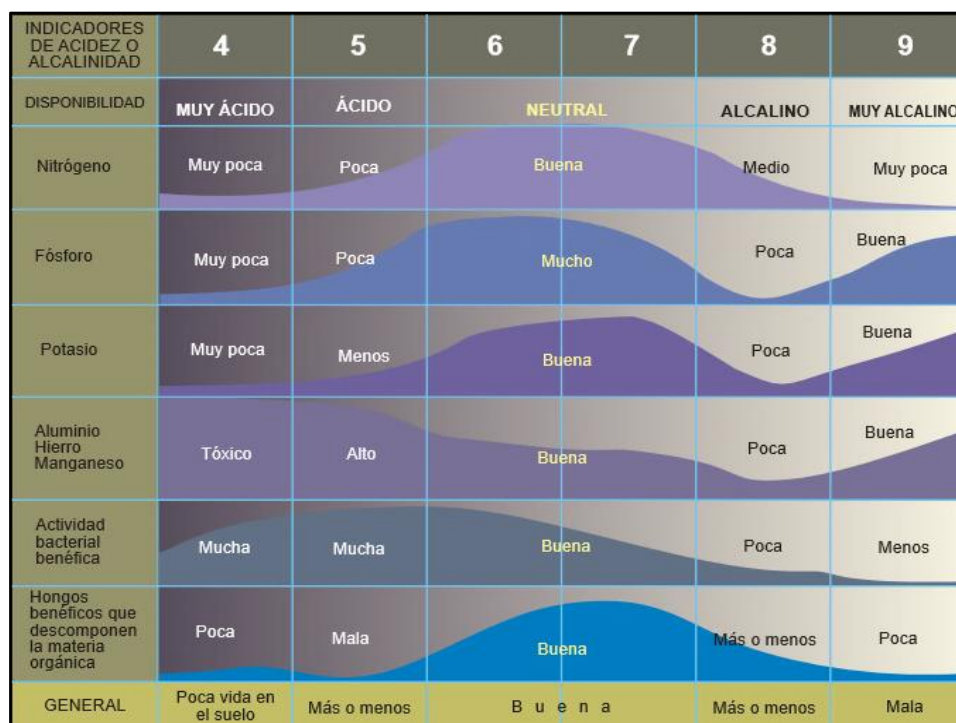
El rango para la interpretación del contenido de fósforo en el suelo de acuerdo al método de análisis Mehlich o Carolina del Norte, es propuesto por Arévalo y Castellano (2009), quienes indican que suelos con menos de 15 miligramos de fósforo por kilogramo de suelo, poseen bajo contenido del elemento, sin embargo suelos con contenidos que oscilan entre 15 y 30 miligramos de fósforo por kilogramo de suelo, poseen un contenido adecuado del mismo, por consiguiente suelos con contenidos de fósforo superior a 30 miligramos por kilogramo de suelo cuentan con un alto contenido de fósforo.

#### **2.4. Acidez del suelo**

La acidez o alcalinidad del suelo es una de las características químicas más importantes para el desarrollo de las plantas, debido a la influencia que ejerce en factores de crecimiento como son: la presencia de elementos tóxicos, la solubilidad de nutrimentos y el crecimiento de microorganismos benéficos o nocivos (Tejeira s.f.) (Figura 1).

Según el autor antes citado, la acidez de los suelos se puede clasificar en acidez activa y acidez intercambiable-potencial. La primera, se refiere al pH y la segunda

al ión hidrógeno ( $H^+$ ) y al aluminio intercambiable ( $Al^{3+}$ ) presentes en el complejo de intercambio de cationes.



**Figura 1.** Relación de los valores de pH con la disponibilidad de algunos nutrimentos importantes del suelo y la presencia de microorganismos benéficos. Fuente: (Arévalo y Castellano 2009).

#### 2.4.1. Acidez activa

La acidez activa – pH se refiere al logaritmo negativo de la concentración o actividad del ion ( $H^+$ ) en la solución del suelo (Tejeira s.f.).

Según el autor antes citado, existe una relación del pH con los microorganismos del suelo, nutrimentos y elementos tóxicos. Los hongos crecen a cualquier pH,

aunque las especies presentes en el suelo, pueden variar según la acidez o basicidad; las poblaciones de bacterias y actinomicetos aumentan con el pH. A pH bajos se solubilizan los nutrimentos hierro, manganeso, cobre y zinc (Fe, Mn, Cu, Zn); a pH altos se solubiliza el nutrimento molibdeno (Mo).

Hay una relación negativa entre la acidez y la presencia de los nutrimentos calcio y magnesio. La solubilidad del fósforo es mayor en las cercanías de un pH neutro, este elemento se precipita como fosfatos de calcio a pH altos o fosfatos de aluminio y hierro a pH bajos.

El aluminio, manganeso y hierro se solubilizan a pH bajos y sus niveles de concentración pueden llegar a ser tóxicas. El pH en suelos ácidos, sólo tiene un efecto negativo directo en las plantas a concentraciones de pH inferiores a cuatro, no así a los pH normales de los suelos. De este modo, los efectos nocivos de pH bajos en el suelo se asocian a la toxicidad por aluminio, manganeso y hierro; a la deficiencia de calcio, magnesio y molibdeno y a la presencia de microorganismos patógenos (Tejeira s.f. y Sánchez 1981).

Existe un rango de interpretación del pH del suelo propuesto por Arévalo y Castellano (2009), donde, los suelos con valores de pH inferiores a 4.4 son extremadamente ácidos, con valores de pH entre 4.5 y 5.0 son muy fuertemente ácidos, de 5.1 a 5.5 son fuertemente ácidos, de 5.6 a 6.0 son moderadamente ácidos y suelos con valores de pH de 6.1 a 6.5 son ligeramente ácidos. Aquellos suelos que poseen valores de pH de 6.6 a 7.3 son suelos neutros, aquellos con valores de 7.4 a 8.0 son medianamente alcalinos y suelos que poseen valores de pH superiores a 8.0 son fuertemente alcalinos.

### **2.4.2. Acidez intercambiable-potencial**

Las arcillas y la materia orgánica del suelo tienen cargas negativas que atraen cationes básicos como calcio, magnesio, potasio, sodio y ácidos como el ion hidrógeno y aluminio; lo que conforma el complejo de intercambio de cationes. La acidez intercambiable - potencial se refiere al ion hidrógeno ( $H^+$ ) y aluminio ( $Al^{3+}$ ) presente en este complejo (Tejeira s.f.).

Los iones de hidrógeno producidos por la descomposición de la materia orgánica son inestables en suelos minerales porque reaccionan con arcillas de silicatos laminares, liberando aluminio intercambiable y ácido silíceo (Coleman y Thomas, citados por Sánchez 1981).

Según el autor antes citado, con valores de pH entre 5.5. y 6 el aluminio intercambiable se precipita, por lo que, con pH del suelo mayores a estos valores, se encuentra poco o nada de aluminio intercambiable.

Los niveles de aluminio en la solución del suelo también dependen del contenido de materia orgánica y el contenido de sales. El aluminio disminuye a medida que aumenta la materia orgánica, debido a que esta, forma complejos muy fuertes con el aluminio; sin embargo, el aluminio aumenta conforme aumenta el contenido de sales, debido a que otros cationes desplazan al aluminio intercambiable por acción de masa (Brenes y Pearson, citados por Sánchez 1981).

Concentraciones de aluminio en la solución del suelo superior a una parte por millón, frecuentemente son causa directa de reducción del rendimiento de los cultivos, causando toxicidad. El aluminio tiende a acumularse en las raíces,

impidiendo la absorción y el traslado de fósforo y calcio hacia la parte aérea de las plantas, produciendo o acentuando las deficiencias del calcio y fósforo (Abruña *et al.*; Villagarcía y Foy, citados por Sánchez 1981).

## **2.5. Estructura y estabilidad de agregados del suelo**

La estructura del suelo se refiere a la agregación de partículas individuales del suelo para generar unidades de mayor tamaño conocidas como agregados o terrones y que son el resultado de procesos pedogenéticos (Moreno *et al.* s.f.).

Los agregados resultan ser las estructuras que confieren al medio edáfico su porosidad y permeabilidad en todo lo relacionado con el flujo de agua y aireación del suelo. Del mismo modo fijan los nutrimentos, poniéndolos a disposición de las plantas (Ibáñez 2016).

El complejo dinámico de agregación es el resultado de la interacción de muchos factores incluyendo el medio ambiente, factores de gestión del suelo, influencia de las plantas y propiedades de la composición mineral, textura, concentración de carbono orgánico del suelo, procesos pedogenéticos, actividad microbial, intercambio de iones, reserva de nutrimentos y humedad variable (KAY, citado por Cotrina 2009).

Según el autor antes citado, la agregación resulta del reordenamiento de las partículas, floculación y cementación, para la formación de los agregados y es necesario que los coloides del suelo se encuentren floculados y que todos los componentes del agregado sean posteriormente estabilizados por un agente cementante; la materia orgánica, los óxidos y los hidróxidos tanto de las partículas

primarias y secundarias del suelo. Se puede incluir, también, los ciclos de humedecimiento y secamiento como un importante factor que interfiere en la agregación del suelo.

La estabilidad de agregados es la capacidad del suelo de mantener su estructura durante la lluvia o el riego (CIMMYT 2013). Los agregados que resisten a las fuerzas del agua se llaman agregados estables al agua (WSA); en general, cuanto mayor sea el porcentaje de agregados estables, menos erosionable será el suelo (Gómez 2013).

Según Boix-Fayos *et al.* citados por Meza y Geissert (2006), la estabilidad de los agregados en agua y su distribución por tamaño son indicadores de la susceptibilidad del suelo a la degradación estructural.

Ibáñez (2016), se refiere a los microorganismos como los principales agentes para la estabilización de los agregados edáficos. Debido a que tanto hongos como bacterias, contribuyen a la estabilización de los agregados del suelo a través de la deposición de polisacáridos extracelulares y la formación de materiales húmicos aromáticos degradados, que forman los complejos arcilla-metales-materia orgánica.

### **2.5.1. Factores que afectan la estabilidad de los agregados**

La estabilidad de los agregados se ve afectada por diferentes factores del suelo:

- **La materia orgánica**

La estabilidad de los agregados aumenta con el contenido de esta, efecto que se ve más pronunciado en suelos con pequeñas cantidades de arcillas (Gómez 2013).

Según Orellana y Pilatti, citados por Cotrina (2009), la materia orgánica del suelo (MOS) es ampliamente reconocida como reservorio de nutrientes para las plantas y el mayor factor de estabilización de la estructura edáfica. Los niveles de materia orgánica (MO) se pueden clasificar en bajo, cuando el porcentaje de MO es inferior al dos por ciento; medio, cuando el porcentaje de MO se encuentra entre dos y cuatro y alto, cuando es superior a cuatro.

- **El contenido de aluminio y el contenido de óxido de hierro**

La estabilidad de los agregados generalmente aumenta con el contenido libre de óxido de hierro, sin embargo, los óxidos de aluminio libres no incrementan sensiblemente la estabilidad de agregados (Kemper, citado por Cotrina 2009; Gómez 2013).

- **El contenido de arcillas del suelo**

El tipo y cantidad de arcilla del suelo afecta la estabilidad de los agregados (Gómez 2013). En general, arcillas de elevada superficie específica (por ejemplo, montmorillonita), tienden a originar mayor agregación que arcillas de baja superficie específica (por ejemplo. caolinita) según Kemper, citado por Cotrina (2009).



- **Las raíces de las plantas**

La arquitectura de las raíces favorece cambios en la estructura del suelo, principalmente en la conectividad de los poros, los cuales se reordenan mejorando el drenaje e incrementando los potenciales mátricos de la rizósfera, observable en todos los casos por un mayor número de macroporos en la rizósfera (Whalley *et al.* citados por Torres *et al.* 2013).

Las modificaciones, producto de la presión que ejercen las raíces en el suelo amplían los poros existentes y crean otros nuevos, generan un mayor empaquetamiento de las partículas y micro agregados, modifican la disposición de las partículas de arcilla. Cerca de la zona de influencia de las raíces (rizósfera), la densidad aparente incrementa entre 12 por ciento y 35 por ciento con respecto de la densidad aparente fuera de la rizósfera; los cambios ocurren a una distancia de entre 50-200 micrómetros alrededor de las raíces y aumentan la estabilidad de los agregados del suelo dentro de la rizósfera (Torres *et al.* 2013).

Los exudados que segregan las raíces alteran el suelo circundante a estas, con la secreción continua de compuestos orgánicos y el crecimiento de células de la cofia, provocando el secado del suelo (Vermeer y McCully; Ray *et al.*; McCully; Sims *et al.* citados por Torres *et al.* 2013). A medida que el suelo se seca, la conductividad hidráulica disminuye, seguido la viscosidad de los exudados aumenta y la resistencia al movimiento de las partículas del suelo en contacto con los exudados se incrementa, alcanzándose el grado de estabilización máximo dentro de la rizósfera (Walker *et al.* citados por Torres 2013).

### **2.5.2. Importancia de la estabilidad de agregados**

Autores como Cotrina (2009) y CIMMYT (20130) resaltan que una adecuada agregación de los suelos, permite la circulación del aire y el agua, la penetración de las raíces y evitan la formación de costras en su superficie; facilitan un buen contacto entre las semillas y el suelo permitiendo una buena absorción de agua y, por ende, una rápida germinación. Con el aumento de la estabilidad de la superficie se reduce la escorrentía, de este modo, la preservación de la estabilidad de los agregados es importante a fin de reducir el sellado superficial y aumentar las tasas de infiltración.

### **2.5.3. Clasificación de los agregados**

Según Cotrina (2009), los agregados del suelo se dividen en dos grandes grupos, de acuerdo con el tamaño (diámetro):

- **Micro agregados:** Miden menos de 250 micrómetros, son partículas primarias del suelo unidas a micro agregados menores. Los agentes de ligazón de estos agregados son: la materia orgánica humificada (polímeros orgánicos), metales o cationes polivalentes, raíces e hifas de hongos, polisacáridos, restos de plantas y microbios encostrados y óxidos amorfos de hierro y aluminio.
- **Macro agregados:** Mayores a 250 micrómetros, consisten de micro agregados unidos entre sí. Los agentes de ligazón son: hifas de hongos, raíces fibrosas, polisacáridos, óxidos de aluminio y hierro (suelos que contienen más del 10 por ciento de óxidos de hierro y aluminio).

La autora anteriormente citada explica, que la diferencia entre macro y micro agregados, es que los primeros son más sensibles a cambios de manejo que los micro agregados y en consecuencia, son considerados un mejor indicador para calidad del suelo. También se forman más rápido que los micro agregados y son más estables al agua que estos. Cuando aumenta la proporción de macro sobre micro agregados aumenta la calidad del suelo, sin embargo, el carbono es más estable en micro agregados que en macro agregados.

La estabilidad de los agregados de acuerdo a su diámetro medio ponderado (DMP) se clasifica como: Inestables, aquellos diámetros inferiores a 0.5 milímetros; ligeramente estable aquellos cuyo DMP se encuentra entre 0.5 y 1.5 milímetros; moderadamente estable cuando el DMP se encuentra entre 1.5 y 3.0 milímetros; son estables aquellos agregados que el DMP se encuentra entre 3.0 y 5.0 milímetros; por último, son muy estables aquellos agregados que su DMP es superior a cinco milímetros (Gómez 2013).

La estabilidad de agregados también se puede clasificar según el porcentaje de agregados estables. De esta manera según el autor antes citado, los agregados estables con porcentajes inferiores a 90 por ciento, tienen una estabilidad muy alta; los agregados estables con porcentajes entre 80 y 90 por ciento, tienen una alta estabilidad; aquellos agregados estables con porcentajes entre 80 y 35 por ciento poseen una estabilidad media; la baja estabilidad de agregados viene siendo dada entonces, por porcentajes de agregados estables entre 35 y 25 por ciento y una estabilidad de agregados muy baja es dada por porcentajes de agregados estables menores a 25 por ciento.

## 2.6. Orden de suelo ultisol

Los ultisoles, representan una superficie en el mundo de 11.5 millones de kilómetros cuadrados, lo que es aproximadamente el 8.45 por ciento de las tierras emergidas (Gisbert *et al.* s.f.). En América tropical, después de los oxisoles, los ultisoles son los suelos más extensos (CIAT 1983).

Los ultisoles, se forman con alta temperatura ambiente, sobre casi cualquier material parental, con la precipitación superando la evapotranspiración y un movimiento vertical de agua a través del perfil de suelo que permite lixiviación de bases (Na, K, Ca Mg), remoción de sílice y acumulación de hierro y aluminio (Wilding *et al.* citados por Chinchilla *et al.* 2011).

Sin embargo, el CIAT (1983), por su parte, dice que estos suelos se asocian a climas cálidos y húmedos que presentan precipitación deficiente, pero asociándolo a que estos pertenecen a deposiciones geomorfológicas viejas, principalmente bajo vegetación de bosque.

En cuanto al tiempo, estos suelos no requieren de tiempo elevado para el desarrollo del perfil, teniendo en cuenta que los procesos formadores determinaran la rapidez de desarrollo de los horizontes en el perfil (Gisbert *et al.* s.f.).

De acuerdo con los autores antes citados, existen procesos formadores de ultisoles como lo son: la eluviación y la iluviación, procesos más importantes en el desarrollo del perfil, dándose el caso de acumulación de arcillas en horizontes profundos del perfil, y produciéndose una pérdida de arcillas en los horizontes

superficiales. El proceso de eluviación produce la movilización y pérdida de materiales, que se desarrolla en los horizontes superficiales, mientras que el proceso de iluviación representa la ganancia de sustancias en los horizontes, siendo el agua el medio de transporte.

Entre los materiales susceptibles a translocación mediante eluviación - iluviación se encuentran: las arcillas, los sesquióxidos y la materia orgánica. En este sentido, en estos suelos la acumulación, descomposición y humificación de la materia orgánica en la superficie del suelo está limitada por la formación de complejos orgánico-minerales. También pueden darse procesos de queluviación de aluminio y hierro, junto con materia orgánica, de las zonas superficiales y su acumulación en las zonas profundas del perfil (Gisbert *et al.* s.f.).

El óxido de aluminio y hierro, se unen a la materia orgánica en forma compleja; las formas complejadas de hierro se asocian directamente a la movilización y transporte de hierro dentro del perfil en forma de quelatos; por lo que la queluviación no es más que la migración de la solución de hierro en el perfil del suelo ( Atkinson y Wright, citados por Besoain 1985).

### **2.6.1. Propiedades químicas**

- Su principal característica es la formación de un horizonte argílico con bajo contenido de bases y acumulación de arcilla iluviada (Soil Survey Staff, citado por Chinchilla *et al.* 2011). El horizonte argílico, es un horizonte superficial con un porcentaje mayor de arcillas filosilicatadas que el material del suelo subyacente (INTA 2016).

Según el INTA (2016), estos suelos también presentan una mezcla de arcilla y cuarzo llamada plintita, rica en hierro y pobre en materia orgánica, la cual, se puede encontrar en la parte superficial o sub-superficial del suelo.

- El color característico de estos suelos se debe básicamente al grado de hidratación del hierro con tonalidades pardo rojizo o rojizo en su estado oxidado y pardo amarillento y amarillento en su forma hidratada (Gisbert *et al.* s.f. e INTA 2016).
- Tienen un alto contenido de aluminio extraíble y son bajos en calcio, por lo que se puede definir como suelos ácidos. Se caracterizan por ser los suelos más meteorizados y más bajos en bases que los alfisoles, ya que tienen menos del 35 por ciento de saturación de bases (INTA 2016).
- Los ultisoles se caracterizan por ser deficientes en macro y micro nutrimentos y algunas veces, por toxicidad de aluminio. Los niveles de fósforo de estos suelos, son generalmente bajos, lo que se considera, una consecuencia natural de óxidos de hierro y aluminio, producto de una meteorización intensiva (Name y Villarreal 2004).

### **2.6.2. Propiedades físicas**

- Según el INTA (2016), los ultisoles se desarrollan en relieves que van desde ligeramente ondulados hasta fuertemente ondulados. Son suelos profundos, y bien desarrollados con una transición difusa entre los horizontes.

- Cuentan con texturas finas a muy finas, presentan una buena estructuración lo que hace que presenten un drenaje interno adecuado.
- Se caracterizan por tener arcillas 1:1 (principalmente caolinita) y óxidos de hierro (Fe) y aluminio (Al).

### **3. MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1. Ubicación y descripción del área de estudio**

El estudio se llevó a cabo en el invernadero del Departamento de Suelos y Aguas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá-sede de Chiriquí, ubicado a 927974.99 Latitud Norte y 353501.27 Longitud Este.

Según Moreno (2017), dentro del invernadero se registran temperaturas promedio de 31.8 grados centígrados, una humedad relativa de 76.3 por ciento y un valor promedio de radiación solar de 184.3 vatios por metros cuadrados.

El área de estudio pertenece al clima subecuatorial con estación seca, este clima se caracteriza por ser cálido, con temperaturas promedio anual, que oscilan entre los 25.8 a 26.4 grados centígrados en tierras bajas que se encuentran por debajo de los 20 metros sobre el nivel del mar. De acuerdo con la clasificación de zonas de vida de Holdridge el invernadero se encuentra en la zona de vida tropical húmedo, la cual posee una precipitación media anual promedio de 2,800 milímetros; la época lluviosa se extiende de mayo a diciembre y la seca, de enero a abril (ANAM, citado por Moreno 2017).



## 3.2. Metodología

La metodología empleada para llevar a cabo la investigación contempló dos fases; una en laboratorio y una en invernadero.

### 3.2.1 Recolección de datos en el invernadero

El estudio se llevó a cabo en macetas con capacidad de 1.2 kilogramos, mediante el diseño de bloques completos al azar en arreglo factorial. Se emplearon cinco tratamientos: testigo sin inóculo (tratamiento uno (T1)), inoculación con  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc) de la bacteria *Bacillus subtilis* (tratamientos del dos al cinco respectivamente (T2, T3, T4 y T5)). De cada tratamiento se realizaron cinco repeticiones con planta de frijol *Vigna sinensis* (Cp) y cinco repeticiones sin planta (Sp) para cuatro periodos de muestreo, a los 30, 60, 90 y 120 días, lo que representó un total de 200 unidades experimentales.

Se utilizó el modelo lineal aditivo:

$$X_{ij} = \mu + \beta_j + \tau_i + e_{ij}$$

Dónde:

$X_{ij}$ = Variable aleatoria observable.

$\mu$ = Media general.

$\beta_j$ = Efecto de j-ésima tratamiento.

$\tau_i$ = Efecto del i-ésima tratamiento.

$e_{ij}$ = Variable aleatorio, independiente de t y  $\beta$ .

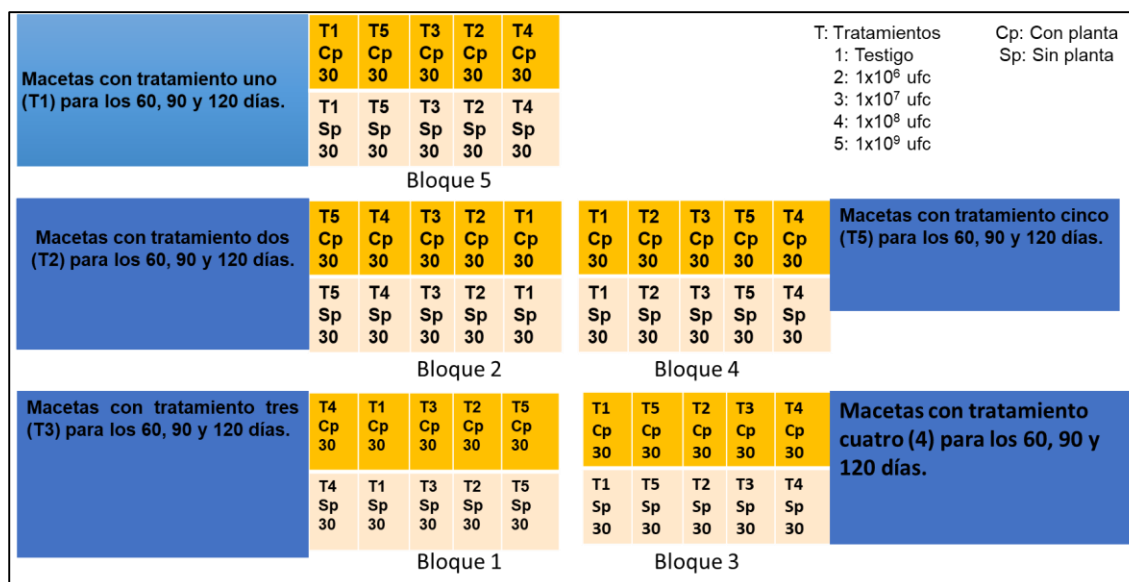
Se extrajeron 400 kilogramos de suelo del horizonte subsuperficial Bt, de un ultisol de la parcela 15 del Centro de Investigación Agropecuaria de Chiriquí (CEIACHI), ubicada a 927973.56 Latitud Norte y 353370.33 Longitud Este.

El suelo extraído fue sometido al proceso de solarizado durante dos meses en el invernadero (técnica empleada para desinfección del suelo). Para este fin, el suelo estuvo dispuesto en bandejas de madera, con profundidad de cinco centímetros, 0.61 metros de ancho, 1.22 metros de largo y cubierto con plástico de polietileno transparente calibre 20 micras.

Aproximadamente, una semana antes de cumplidos los dos meses de solarizado del suelo, se procedió a la germinación de las semillas de *Vigna sinensis* en cuatro bandejas de germinación de 72 orificios. El sustrato empleado para este proceso estuvo compuesto de suelo proveniente del horizonte Bt del estudio, el cual fue secado previamente en el horno y mezclado con sustrato inerte de perlita, resultando en 10 litros de sustrato, en una proporción 2:1; dos partes de perlita y una parte de suelo.

Al finalizar el proceso de solarización, se adicionaron 1.2 kilogramos de suelo en 200 macetas acorde con el diseño experimental. Antes se colocó zarán en el fondo de las macetas para impedir que el suelo saliera por los orificios de drenaje.

Se procedió a ordenar las macetas en las mesas del invernadero, de acuerdo al diseño experimental por bloque (repetición) iniciando con las macetas de los primeros 30 días y dejando en reserva las macetas para reemplazo a los 60, 90 y 120 días, ordenadas por tratamientos (Figura 2).

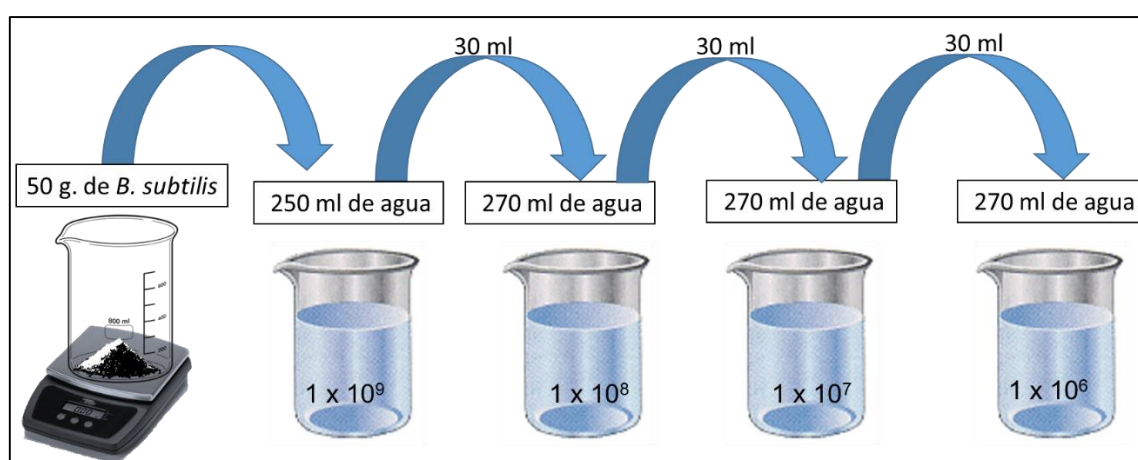


**Figura 2.** Arreglo en bloques completos al azar del estudio en invernadero, Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Una vez colocadas las macetas al azar, se llevó el suelo a humedad cercana a capacidad de campo y se trasplantaron las plántulas en las 100 macetas de los tratamientos con planta. Debajo de cada maceta se colocó un plato de aluminio de 18 centímetros de diámetro, para mantener una lámina de agua permanente y de este modo permitir a las plantas absorber agua por capilaridad, sin embargo, se regaron las plantas de forma manual y diariamente con el fin de mantener el suelo a humedad cercana a capacidad de campo.

Posteriormente se adicionaron cinco mililitros de inóculo de *Bacillus subtilis* (concentración 1:  $1 \times 10^6$ , concentración 2:  $1 \times 10^7$ , concentración 3:  $1 \times 10^8$  y concentración 4:  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias) a las macetas de acuerdo a los tratamientos con y sin planta. La cepa bacteriana se obtuvo del producto comercial M4, (*B. subtilis*).

Para realizar la inoculación de *Bacillus subtilis*, se preparó una concentración madre de 50 gramos de *B. subtilis* en 250 mililitros de agua desionizada, partiendo de la concentración establecida en el producto, la cual indica que un gramo de producto en cinco mililitros de agua equivale a  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (Figura 3).



**Figura 3.** Preparación de la solución madre de inóculo *B. subtilis* a  $1 \times 10^9$  y dilución a las concentraciones de los tratamientos  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia.

Una vez establecido el diseño experimental en invernadero, se realizaron muestreos destructivos a los 30, 60, 90 y 120 días, los cuales consistieron en cortar las plantas desde la base para su análisis de materia seca; extraer 10 gramos de suelo para la prueba de concentración de bacterias y en retirar las macetas de los bloques, siendo reemplazadas por las macetas nuevas correspondientes a los tratamientos del siguiente periodo de muestreo.

Las muestras de suelo reemplazadas se colocaron en los platos de aluminio para secar al aire y posteriormente realizar los análisis de laboratorio; una vez seco el suelo se guardó en bolsas de papel y se trasladó al laboratorio donde se tomó una muestra de suelo de cada tratamiento y se tamizó con un tamiz de maya dos milímetros para analizar las variables químicas (pH, aluminio intercambiable y fósforo disponible) el suelo no tamizado se utilizó para el análisis de estabilidad de agregados.

### **3.3. Variables de respuesta evaluadas**

Las variables de respuesta evaluadas fueron: variables químicas (pH, aluminio intercambiable, fósforo disponible), variables biológicas (materia seca, concentración de bacterias) y variables físicas como la estabilidad de agregados. Se realizaron análisis previos al suelo del estudio de estas variables, para obtener valores de las condiciones iniciales del suelo antes de recibir las diferentes dosis de *B. subtilis*, con excepción del análisis de materia seca y concentración de bacterias, las cuales se realizaron a partir de los primeros 30 días del estudio.

#### **3.3.1. Estabilidad de agregados**

La prueba de estabilidad de agregados se realizó por el método de tamizado en húmedo adaptado del (CIMMYT 2013 y CIMMYT 2014). El cual consiste en sumergir el suelo en agua y tamizarlo para imitar las fuerzas naturales que actúan cuando el agua entra en los agregados del suelo y de esta manera determinar la capacidad que tiene el suelo de mantener su estructura durante la lluvia o el riego (ANEXO I).

El estudio, consistió en cinco tratamientos con cinco repeticiones con planta y cinco repeticiones sin planta; para la prueba de estabilidad de agregados se unieron 50 gramos de cada repetición para obtener una muestra representativa con planta y una muestra representativa sin planta de cada tratamiento, por cada uno de los periodos, lo que resultó en un total de 40 muestras para este análisis.

### **3.3.2. pH**

El pH se midió por el método potenciométrico, en una suspensión suelo agua en proporción volumétrica 2:1 (UCR s.f.a).

### **3.3.3. Disponibilidad de fósforo en el suelo**

La determinación del fósforo disponible en el suelo se realizó por el método de Mehlich o Carolina del Norte (extractante ácido sulfúrico al 0.025 N – ácido clorhídrico al 0.05 N y colorimetría sulfomolibdica a 660 nanómetros (nm) (Samudio 1998).

### **3.3.4. Concentración de aluminio intercambiable**

La determinación de acidez y aluminio intercambiable en suelos se realizó por titulación de acuerdo a la guía metodológica del Laboratorio de Suelos y Foliares de la Universidad de Costa Rica (UCR s.f.b).

### **3.3.5. Concentración de bacterias**

La concentración de las bacterias se determinó por el método de turbidimetría utilizando la Escala de McFarland a 546 nanómetros (Granda s.f.), la cual consiste en mezclar ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al uno por ciento a una solución acuosa de

cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ) al uno por ciento, al unirlos se forma un precipitado de sulfato de bario (Cuadro II). El patrón 0.5 de McFarland corresponde a una suspensión homogénea de bacteria de  $1.5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia por mililitro. De esta manera se crea una curva patrón que permite comparar las absorbancias de las muestras con inoculo con el equivalente en la curva de McFarland.

Para realizar la prueba de McFarland, a los 30 días cuando el suelo aún estaba a humedad cercana a capacidad de campo, se extrajeron 10 gramos de suelo de las macetas, los cuales se pesaron en tubos para centrífuga y se trasladaron al laboratorio donde se les agregó 10 mililitros de agua (proporción 1:1). Se colocaron en la centrifuga por 10 minutos aproximadamente a 4,000 revoluciones por minutos (rpm), posteriormente se tomó una alícuota de dos mililitros y se leyó su absorbancia en espectrofotómetro a 546 nanómetros.

Posteriormente se realizó una curva patrón formada por patrones de  $0.75 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$  y  $9 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias, obteniendo una ecuación de regresión lineal.

**CUADRO II.** ESCALA DE McFARLAND PARA CUANTIFICAR LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS POR TURBIDIMETRÍA.

Tubo	Cl <sub>2</sub> Ba 1%	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ufc/ml
1	0.1	9.9	3x10 <sup>8</sup>
2	0.2	9.8	6x10 <sup>8</sup>
3	0.3	9.7	9x10 <sup>8</sup>
4	0.4	9.6	3x10 <sup>9</sup>
5	0.5	9.5	3x10 <sup>9</sup>
6	0.6	9.4	3x10 <sup>9</sup>
7	0.7	9.3	3x10 <sup>9</sup>
8	0.8	9.2	3x10 <sup>9</sup>
9	0.9	9.1	3x10 <sup>9</sup>
10	1.0	9.0	3x10 <sup>9</sup>

Fuente: (Granda s.f.).

### 3.3.6. Rendimiento de biomasa

Para la estimación del rendimiento de biomasa del frijol *Vigna sinensis L.* en cada uno de los tratamientos, se realizaron muestreos destructivos cada 30 días. Las plantas se cortaron desde la base, se colocaron en bolsas de papel y se trasladaron al laboratorio, donde fueron pesadas y secadas en horno a 65 grados centígrados por 48 horas. (López *et al.* 2014).

### 3.4. Análisis de datos

Los resultados de las variables químicas (pH, aluminio intercambiable y fósforo disponible) y de las variables biológicas (materia seca y concentración de bacterias) se analizaron con el paquete estadístico SAS (López *et al.* 2000).



Obteniéndose análisis de varianza y prueba de comparación de Rangos Múltiples de Duncan para medias de tratamientos con un alfa ( $\alpha$ ) de 0.05.

Los resultados de los análisis de estabilidad de agregados, fueron analizados de manera cuantitativa a partir de los porcentajes de agregados estables del suelo (Gómez 2013).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis de las variables de estudio previo a la inoculación del suelo con *B. subtilis*

Previo a la inoculación con *B. subtilis*, el ultisol estudiado presentó un valor de pH de 4.6, considerado muy fuertemente ácido; baja disponibilidad de fósforo, equivalente a 9.2 partes por millón; la concentración de aluminio intercambiable se encontraba en 1.93 cmol<sub>(+)</sub>/kg de suelo. Inicialmente el suelo presentó una estabilidad estructural moderadamente estable, con un diámetro medio ponderado (DMP) de 2.15 milímetros y un porcentaje de agregados estables del 94.3 por ciento (Cuadro III).

**CUADRO III.** DATOS INICIALES DEL SUELO DE ESTUDIO, PREVIOS A LA INOCULACIÓN CON *Bacillus subtilis*.

Valores iniciales de las variables de investigación				
pH	Aluminio intercambiable (cmol <sub>(+)</sub> /kg)	Fósforo disponible (ppm)	Estabilidad de agregados	
			Diámetro medio ponderado (mm)	Porcentaje de agregados estables (%)
4.46	1.93	9.2	2.15	94.3

## 4.2. Análisis de varianza

El análisis de varianza para los datos de las variables estudiadas: pH, aluminio intercambiable, fósforo disponible, concentración de bacterias y materia seca, mostró que no existen diferencias significativas entre bloques ( $p > 0.05$ ) para las variables de respuesta, con excepción del pH y la concentración de bacterias donde se presentó una diferencia altamente significativa ( $p < 0.01$ ), lo que puede deberse a la variabilidad de la ubicación de las mesas en el invernadero (Cuadro IV).

Se observó un efecto altamente significativo ( $p < 0.01$ ) del tiempo de muestreo para todas las variables, de igual forma una interacción altamente significativa ( $p < 0.01$ ) del tiempo de muestreo con la presencia y ausencia de plantas (Tiempo x Cp y Sp) para las variables de pH y fósforo, más no, para las variables aluminio, concentración de bacterias y materias seca ( $p > 0.05$ ).

Es importante señalar que las diferentes concentraciones de bacterias ( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$ ), no tuvieron un efecto significativo en ninguna de las variables de respuesta del estudio y tampoco interaccionaron con los demás factores. Esto sugiere que el tiempo de muestreo y la presencia o ausencia de plantas en el medio y su interacción son los factores que más afectaron las variables medidas.

**CUADRO IV.** ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS DATOS DE pH, CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS, CONCENTRACIÓN DE ALUMINIO INTERCAMBIABLE, DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO Y MATERIA SECA DE UN ULTISOL. CEIACHI, FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS.

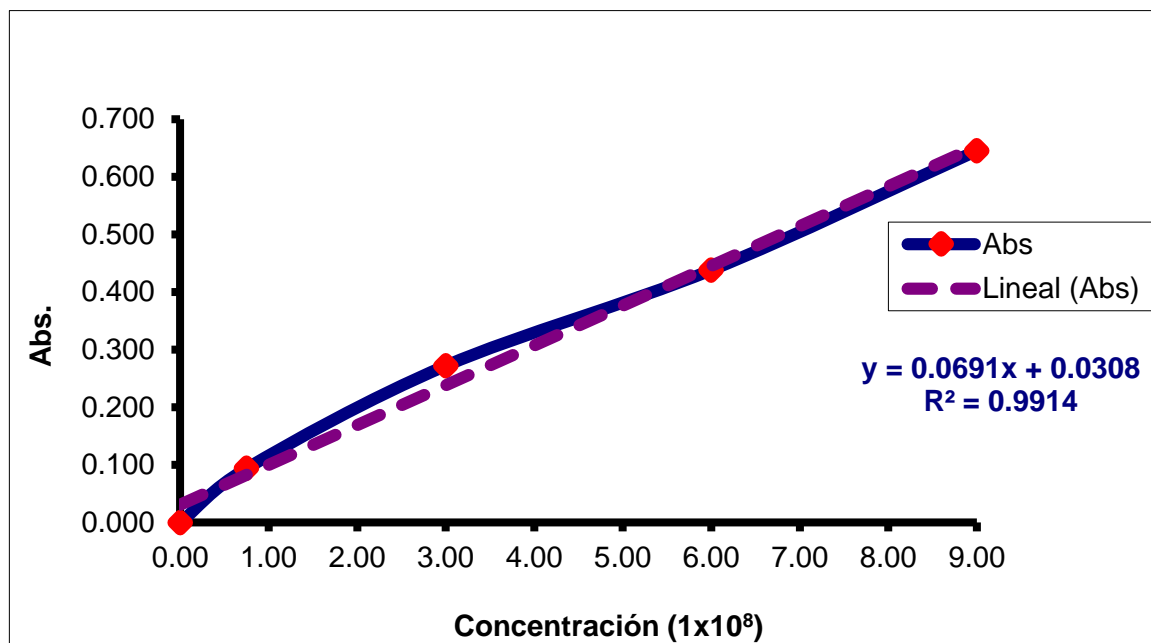
FUENTE	Pr>F				
	pH	Concentración de bacterias	Aluminio	Fósforo	Materia seca
Bloque	0.0053 **	0.0049 **	0.3158 NS	0.0911 NS	0.5728 NS
Tiempo	0.0001 **	0.0001 **	0.0001 **	0.0001 **	0.0001 **
Tratamiento	0.1328 NS	0.1236 NS	0.8849 NS	0.4980 NS	0.3602 NS
Con planta (Cp) y sin planta (Sp)	0.0007 **	0.2964 NS	0.5411 NS	0.0408 **	.
Tiempo x Tratamiento	0.9278 NS	0.1104 NS	0.5764 NS	0.4879 NS	0.3745 NS
Tiempo x Cp y Sp	0.0015 **	0.1402 NS	0.5265 NS	0.0007 **	.
Tratamiento x Cp y Sp	0.2832 NS	0.8049 NS	0.4602 NS	0.6629 NS	.
Tiempo x Tratamiento x Cp y Sp	0.0800 NS	0.9115 NS	0.9832 NS	0.6040 NS	.

NS= No significativo.

\*\*= Efecto significativo al nivel de probabilidad del 1%.

### 4.3. Curva de calibración bacteria suelo

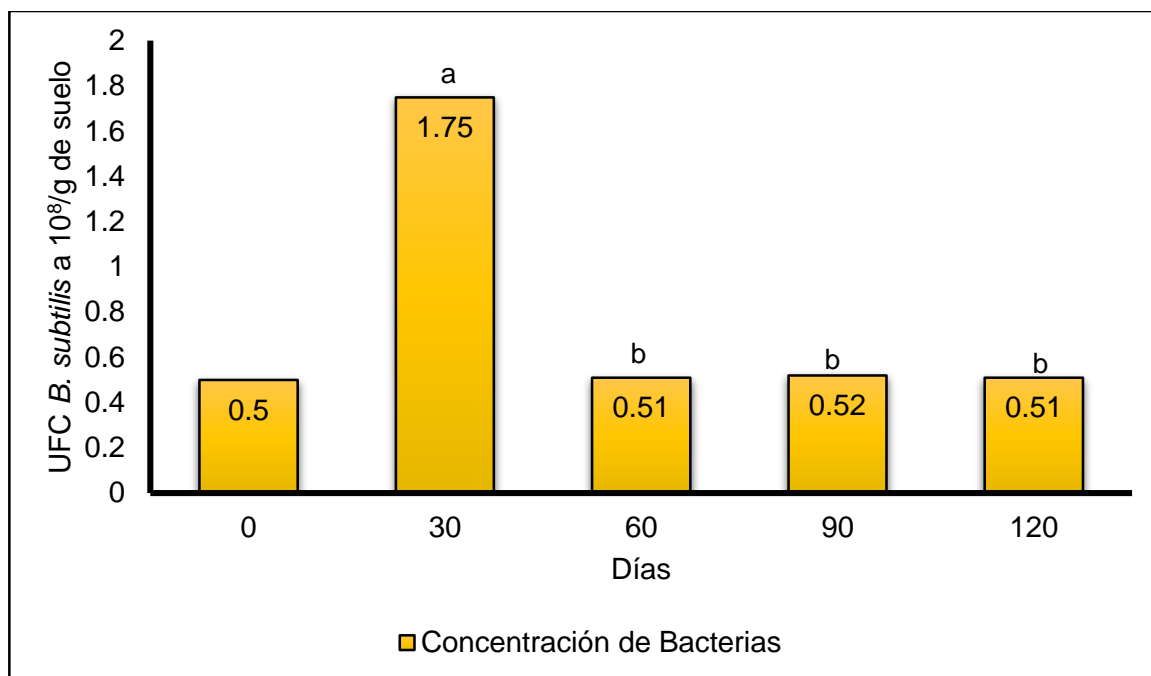
Se obtuvo una curva patrón de regresión lineal de la escala de McFarland (Figura 4), la cual permite comparar las absorbancias de las muestras de suelo inoculadas con *Bacillus subtilis* con las absorbancias patrones de la metodología de McFarland, las cuales están expresadas a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias. La misma dio como resultado un  $R^2$  de 0.9914, lo que valida el método implementado para determinar la concentración de bacterias.



**Figura 4.** Curva de calibración, bacteria-suelo por la escala de McFarland.

#### 4.4. Concentración de bacterias presentes en el suelo

Se encontró un efecto altamente significativo del tiempo de muestreo ( $p < 0.01$ ) sobre la variable concentración de bacterias (Figura 5). La concentración de bacterias a los 30 días del estudio presentó un incremento significativo, con una población bacteriana de  $1.75 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (ufc/g de suelo). La concentración de bacterias disminuyó sin diferencias significativas en los 60, 90 y 120 días con valores cercanos a la concentración inicial que fue de 0.5 unidades formadoras de colonia por gramo de suelo.



**Figura 5.** Comportamiento de la población de *B. subtilis* en un ultisol inoculado con diferentes concentraciones de bacterias.

Letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Acosta y Ramírez (2010), señalando que la concentración bacteriana de *B. subtilis* incrementó al inicio del experimento; sin embargo, disminuyó a través del tiempo. Esto puede deberse a la presencia de poblaciones de microorganismos endémicos del suelo que no fueron eliminados totalmente por el proceso de solarizado y que compitieron con *B. subtilis* inoculado, provocando así la disminución de su población conforme avanzó el estudio.

Por otro lado, Muhammad *et al.* (2018), encontraron un incremento en la concentración de bacterias, utilizando microorganismos (*Bacillus* sp. MWT-14),

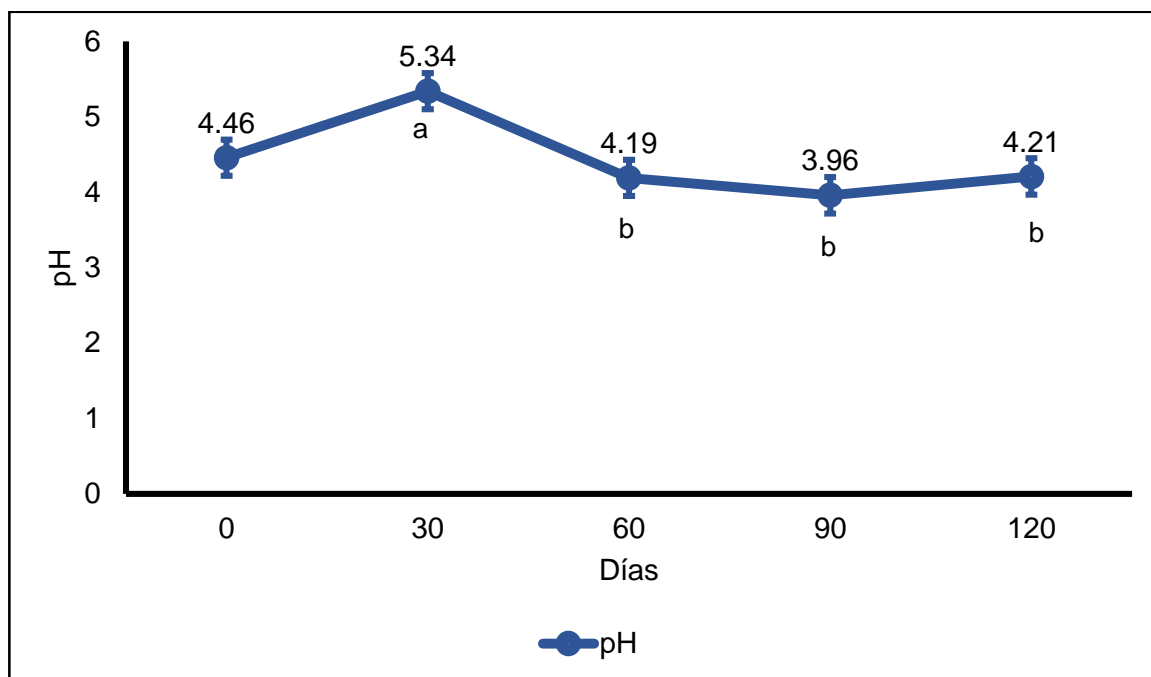
fósforo bio-orgánico (fosfato de roca, compost y residuos de biogás), lo que permite inferir que la disminución de la población bacteriana puede estar relacionada al bajo contenido de fósforo en el suelo estudiado, ya que los microorganismos requieren de energía (ATP) para sobrevivir y el fósforo es una de las fuentes de energía, participando en las principales vías metabólicas (Samudio 1997).

#### **4.5. Variación del pH del suelo a través de los tiempos de muestreo**

Existen diferencias significativas de los valores de pH a través del tiempo. El valor de pH a los 30 días difiere significativamente con los valores de pH de los 60, 90 y 120 días (Figura 6).

A los 30 días hubo un incremento significativo del pH a 5.34, respecto al pH inicial que fue de 4.46; sin embargo, a partir de los 30 días, el pH disminuyó hasta el final del estudio, sin diferencias significativas. Estos resultados coinciden con lo informado por Acosta y Ramírez (2010), donde el pH incrementó hasta los 90 días y luego disminuyó.

Esto puede deberse, a que a pesar de que las diferentes concentraciones de bacterias aplicadas como tratamientos al suelo, no incidieron significativamente en el pH, este incremento a los 30 días está probablemente relacionado con la presencia de *B. subtilis*, ya que según autores como (Acosta y Ramírez 2010 y Cañas s.f.), estas bacterias tienen la capacidad de favorecer la precipitación de carbonato de calcio provocando un “encalamiento biológico”, producir exudados bacterianos y condiciones alcalinas en el medio.



**Figura 6.** Variación del pH a través del tiempo de estudio por efectos de la inoculación con diferentes concentraciones de *B. subtilis* en un ultisol.

Letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Barras indican el error estándar.

#### 4.6. Comportamiento de la concentración de aluminio intercambiable en el suelo

Los resultados de la prueba de Rangos Múltiples de Duncan para la variable aluminio, indican una disminución de la concentración de aluminio intercambiable durante los 120 días del estudio con respecto a la concentración inicial de 1.93  $\text{cmol}_{(+)}/\text{kg}$  de suelo (Figura 7).

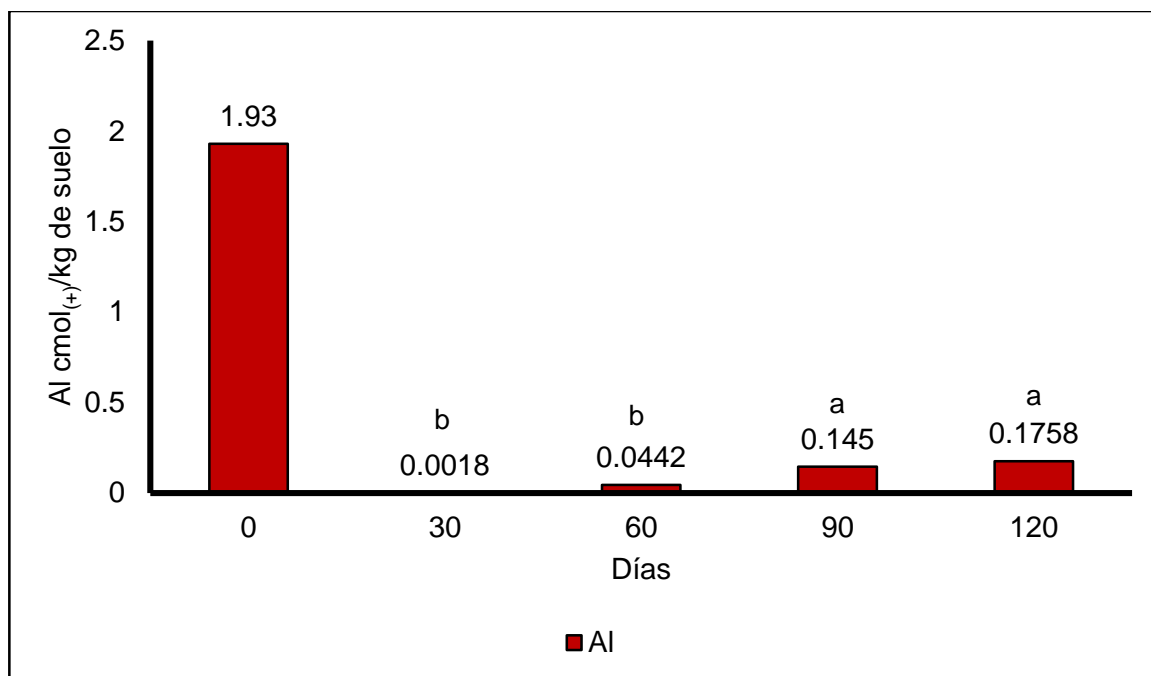
Existen diferencias significativas entre las concentraciones de aluminio intercambiable de los 30 y 60 días con las concentraciones de los 90 y 120 días.



Siendo las concentraciones de los 30 y 60 días menores, con valores de 0.0018 y 0.0042  $\text{cmol}_{(+)}/\text{kg}$  de suelo respectivamente, sin embargo, a partir de los 60 días el nivel de las concentraciones de aluminio comienza a incrementarse hacia los 90 y 120 días con valores de 0.145 y 0.1758  $\text{cmol}_{(+)}/\text{kg}$  de suelo respectivamente.

Este comportamiento de la concentración de aluminio intercambiable es similar al ocurrido en el estudio de Acosta y Ramírez (2010), donde la concentración de aluminio intercambiable disminuyó durante todo el experimento con respecto a la concentración inicial.

La disminución del aluminio intercambiable durante los 30 y 60 días puede deberse al incremento inicial del pH a los 30 días, ya que autores como (Munera y Meza s.f., Sánchez 1981, Acosta y Ramírez 2010 y Llanos 2017) indican que las concentraciones del aluminio disminuyen al incrementar el pH y según Oliva, (2009) antagónicamente las concentraciones de aluminio se incrementan con pH inferior a cinco, lo que ocurrió en su estudio, en suelos de la cuenca del Pacífico en El Salvador, Honduras y Nicaragua, donde con pH superiores a 5.5. el aluminio intercambiable disminuyó y se incrementó con pH inferiores a 5.5.



**Figura 7.** Variación de la concentración de aluminio intercambiable durante 120 días en un ultisol inoculado con *Bacillus subtilis*.

Letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

#### 4.7. Comportamiento de la concentración de fósforo disponible en el suelo

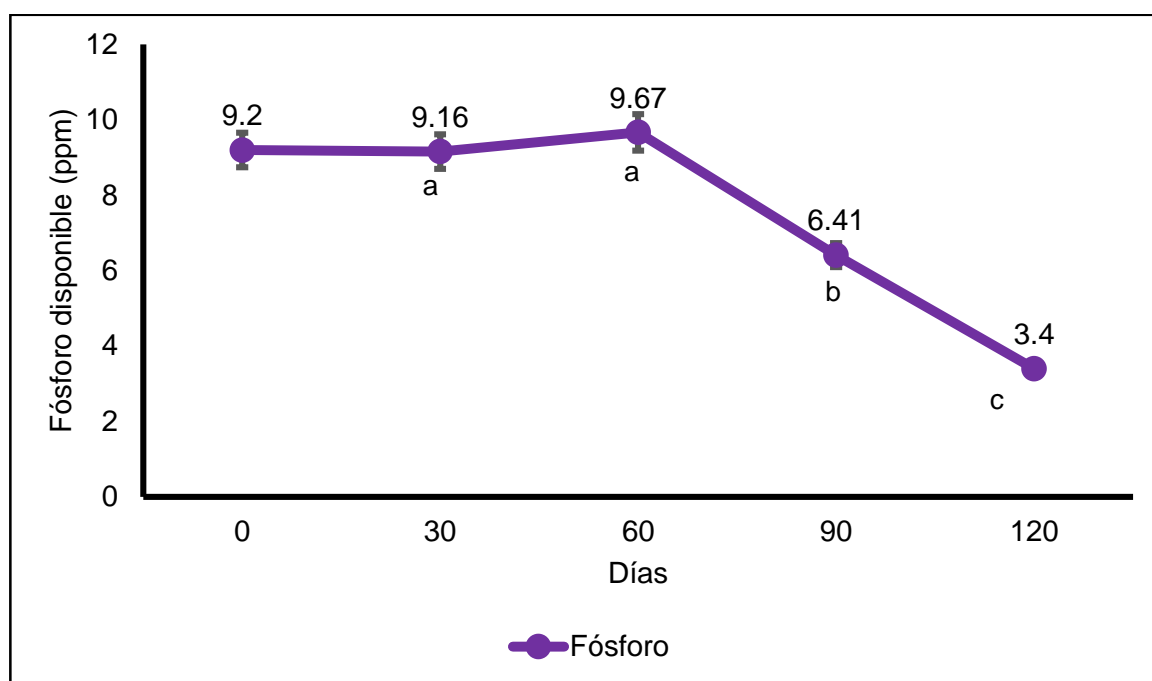
Los resultados de la prueba de Rangos Múltiples de Duncan para la variable fósforo muestran valores similares de fósforo disponible al valor inicial en las concentraciones de los 30 y 60 días sin diferencias significativas, siendo a los 60 días el tiempo donde se presenta la concentración más alta de fósforo disponible (9.67 partes por millón). Estos valores difieren significativamente con la concentración de fósforo a los 90 días y esta a su vez con la concentración de los 120 días, donde el valor de fósforo es significativamente menor con 3.4 partes por millón de fósforo disponible (Figura 8).

Acosta y Ramírez (2010), reportaron un incremento de la concentración de fósforo disponible hasta los 90 días, momento en que disminuyó hasta los 120 días, lo que se relaciona con el incremento del pH hasta los 90 días en su estudio y la disminución al final del experimento por absorción del elemento por la planta. Sin embargo, en el presente estudio el pH disminuyó a partir de los 30 días y aunque la concentración de aluminio disminuyó para este periodo, tuvo una tendencia al incremento hacia los 60, 90 y 120 días, lo que se atribuye a lo sugerido por (Munera y Meza s.f. y Fernández 2007), en donde señalan que en los suelos ácidos existen concentraciones de hidróxidos de aluminio que favorecen la retención del fósforo en la superficie.

Cisneros *et al.* (2017), obtuvieron mayores resultados, tanto de pH como de fósforo con la aplicación de *Kocuria sp.* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo, ellos aplicaron pulpa de café al suelo como aporte de materia orgánica, contrario a lo que se realizó en la presente investigación, donde no se aplicó al suelo más que el inóculo de *B. subtilis* y agua. La aplicación de materia orgánica (pulpa de café) posiblemente sirvió de aporte de energía a las bacterias incrementando su capacidad de solubilización como también pudo tener un efecto sinérgico entre los microorganismos del compost (suelo pulpa de café) con los microorganismos inoculados, provocando una disponibilidad del fósforo proveniente de la mineralización de la pulpa de café.

La baja solubilidad de fósforo durante el estudio también pudo deberse a la baja disponibilidad del elemento en el suelo y a la falta de una fuente que le suministrara del mismo a las bacterias, lo que se puede relacionar con lo

implementado por Muhammed *et al.* (2018), quienes además de aplicar bacterias solubilizadoras de fósforo aplicaron en conjunto fósforo bio-orgánico y fertilizante obteniendo mejores resultados que la aplicación individual de cada uno, lo que revela un efecto sinérgico entre bacterias y biofertilizante; la fuente de fósforo colabora en el crecimiento bacteriano que a su vez mejora la solubilidad y liberación de fósforo del fertilizante.



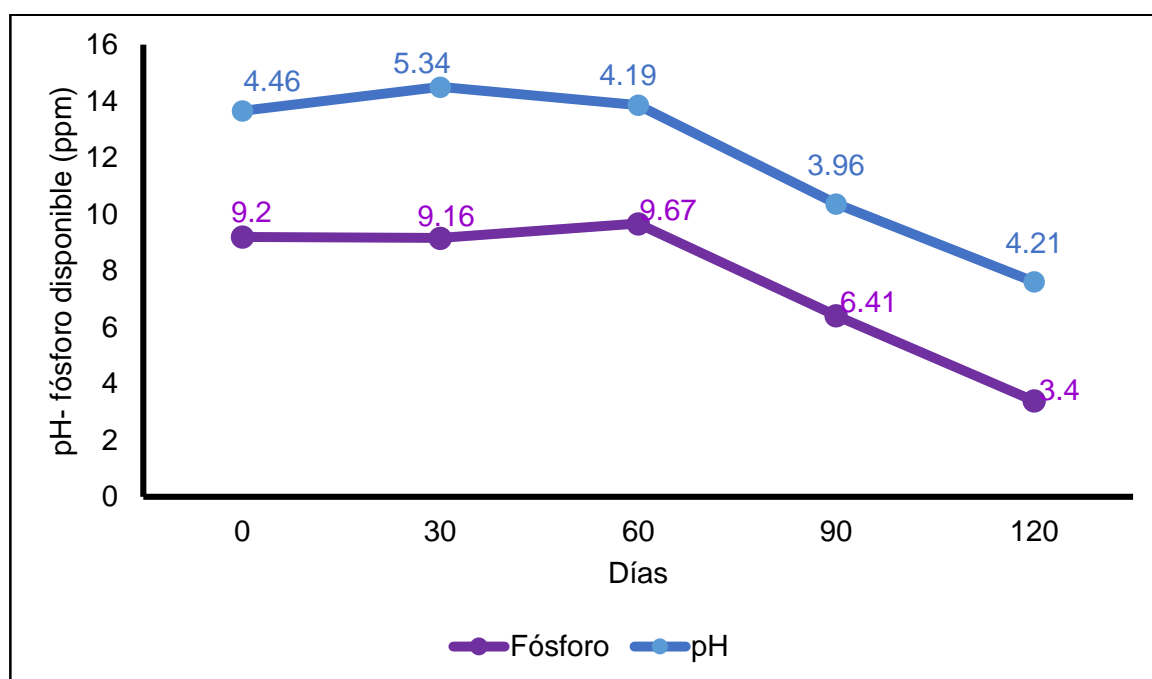
**Figura 8.** Variación de la concentración de fósforo disponible durante 120 días en un ultisol inoculado con *Bacillus subtilis*.

Letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Barras indican el error estándar.

#### 4.8. Interacción pH-fósforo- aluminio

Los resultados indican que existe una relación directamente proporcional entre las medias de las variables pH-fósforo (Figura 9).

Se presenta un incremento inicial del pH y del fósforo a los 30 días de 5.34 y 9.16 partes por millón respectivamente con respecto a las concentraciones iniciales, la mayor disponibilidad de fósforo se presenta a los 60 días y luego disminuye hasta los 120 días, lo que afirma que a medida que los niveles de pH se tornan ácidos y la concentración de aluminio comienza a incrementarse, la disponibilidad de fósforo disminuye.

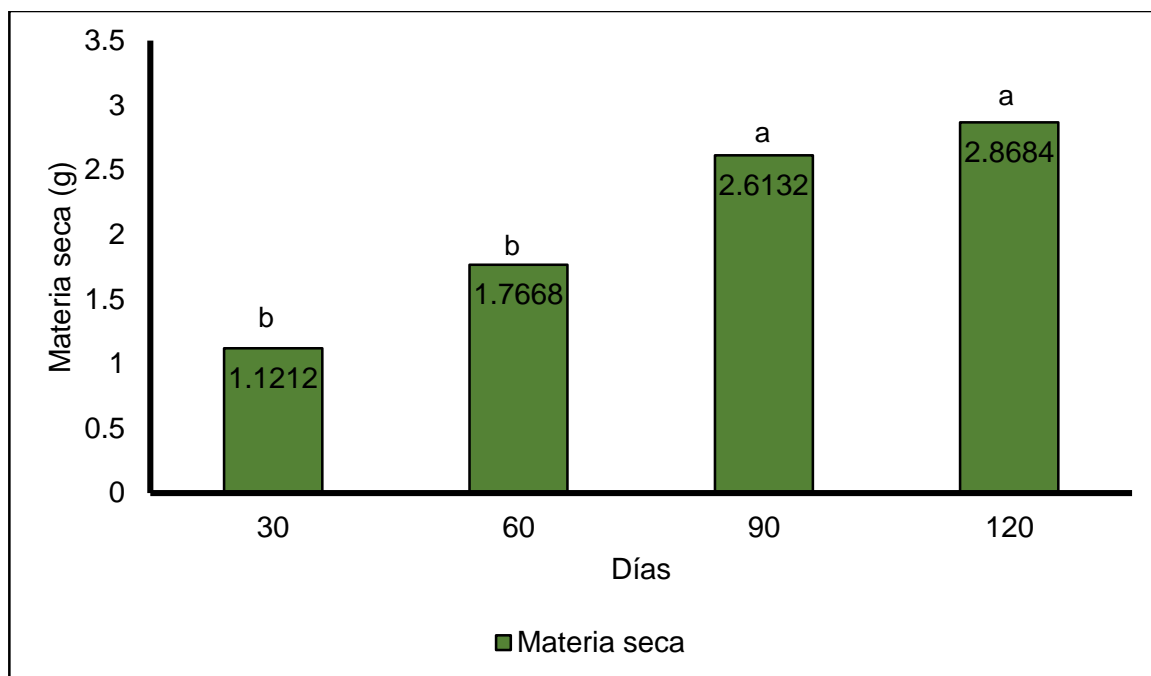


**Figura 9.** Interacción pH-fósforo de un ultisol inoculado con diferentes concentraciones de *Bacillus subtilis* durante 120 días.

#### **4.9. Producción de materia seca de *Vigna sinensis***

Los resultados de la prueba de Rangos Múltiples de Duncan para la variable materia seca, muestran que existen diferencias significativas entre las medias de producción de materia seca de los 30 y 60 días con las medias de producción de materia seca de los 90 y 120 días (Figura 10), siendo en estos dos últimos periodos los que presentan mayor producción, con valores de 2.61 gramos y 2.86 gramos de materia seca respectivamente.

Estos resultados pudieran relacionarse con lo reportado por Ovando (2012), quien indicó un efecto positivo en el crecimiento vegetal en frijol *Vigna unguiculata* por el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Azotobacter* y *Rhizobium*); ya que la acción estimuladora de estos microorganismos estimulan la eficiencia de las plantas en la acumulación de nutrimentos hacia los sumideros en posteriores estadíos como lo son la floración y llenado de grano (etapa final). De este modo, el crecimiento vegetal pudo haber sido influenciado por las condiciones favorables que se dieron entre los 30 y 60 días que se reflejan el ciclo fenológico de la planta.



**Figura 10.** Producción de materia seca de *Vigna sinensis*, en un ultisol inoculado con *Bacillus subtilis*.

Letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

#### 4.10. Efecto de la presencia o ausencia de plantas

Los resultados indican, que no hubo un efecto significativo ( $p > 0.05$ ) de la presencia o ausencia de plantas sobre las variables aluminio intercambiable y concentración de bacterias, sin embargo, para las variables pH y concentración de fósforo disponible si hubieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la presencia y ausencia de plantas (Cuadro V).

**CUADRO V.** EFECTO DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE PLANTAS EN LAS VARIABLES DE RESPUESTA EN UN ULTISOL INOCULADO CON *Bacillus subtilis*.

Variables	Con planta (Cp)	Sin planta (Sp)
pH	4.2518 <sup>b</sup>	4.6006 <sup>a</sup>
Aluminio	0.09710 <sup>a</sup>	0.08630 <sup>a</sup>
Fósforo	7.8252 <sup>a</sup>	6.4896 <sup>b</sup>
Concentración de bacterias	0.78872 x10 <sup>8</sup> <sup>a</sup>	0.85796 x10 <sup>8</sup> <sup>a</sup>

Letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

En el caso del pH, las concentraciones son mayores en tratamientos sin planta, lo que coincide con lo reportado por Acosta y Ramírez (2010), relacionándose con la pérdida de cationes del suelo que ocurre por absorción de las plantas, y que para mantener el equilibrio en su interior estas liberan iones de hidrógeno ( $H^+$ ) al medio incrementando la acidez (Espinosa y Molina 1999).

Acosta y Ramírez (2010), obtuvieron mayores concentraciones de fósforo disponible, en los tratamientos en ausencia de plantas, sin embargo en el presente estudio ocurrió lo contrario; las mayores concentraciones de fósforo se presentan en los tratamientos con planta, lo que puede deberse a la producción de ácidos orgánicos y enzimas fosfatasa que no solo son producidos por parte de microorganismos sino también por las raíces de las plantas (Samudio 1997, Tejera *et al.* 2011, Cisneros *et al.* 2017, Llanos 2017, Muhammad *et al.* 2018).

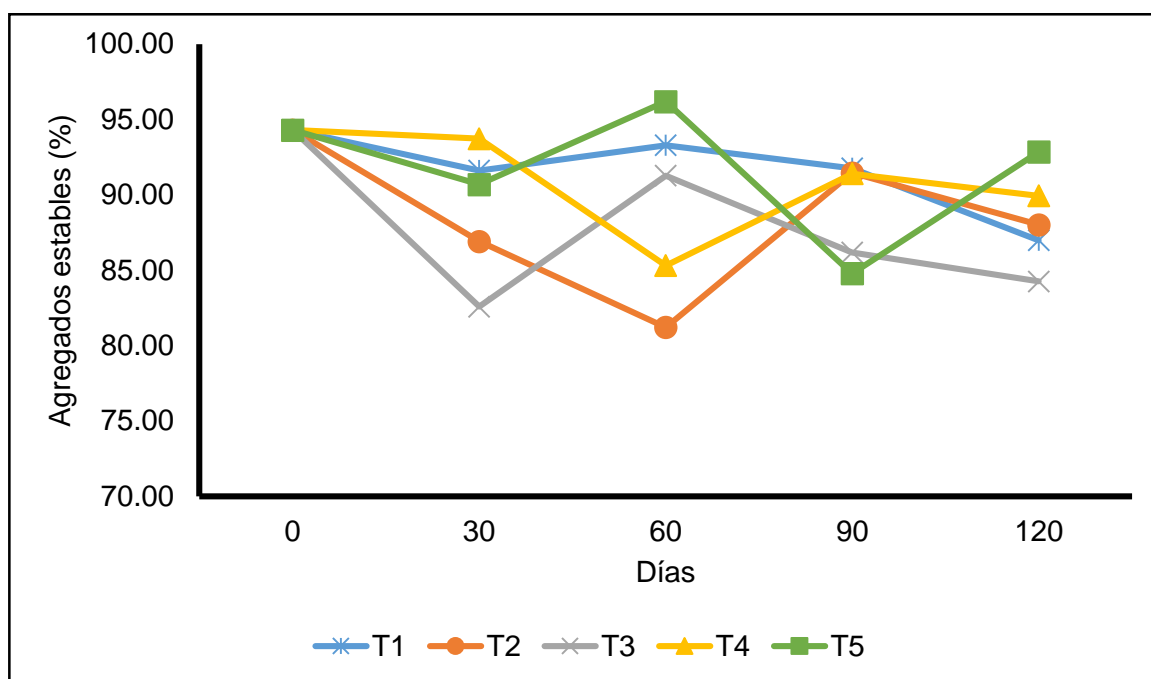


#### 4.11. Estabilidad de agregados

Para la clasificación de la estabilidad de agregados se tomaron en cuenta los porcentajes de las tres primeras fracciones de suelo que se encuentran entre cuatro y 0.25 milímetros. De acuerdo a esto, se obtuvieron porcentajes de agregados estables superiores a 80 por ciento lo que determina que el ultisol estudiado posee de alta a muy alta estabilidad de agregados, de acuerdo a la clasificación de Gómez (2013).

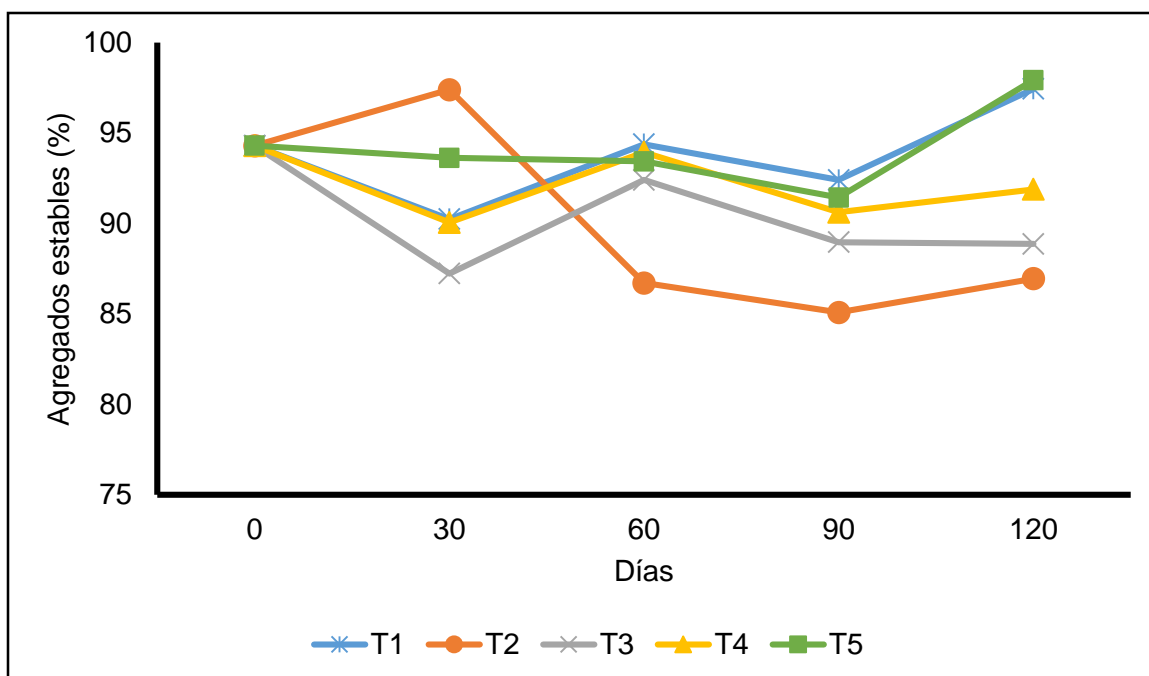
En los tratamientos con planta, el porcentaje de agregados estables disminuyó en todos los tratamientos con planta respecto al porcentaje inicial que fue de 94.3 por ciento. Solo hubo un incremento en el porcentaje de agregados estables en el tratamiento cinco (T5) que equivale a  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonia con 96.18 por ciento a los 60 días, luego disminuyó a los 90 días y aumentó a los 120 días hasta alcanzar un porcentaje de agregados estables cercano al inicial (Figura 11).

Si bien es cierto que las plantas contribuyen a la estabilidad de agregados por medio de sus exudados en asociación con la actividad de los microorganismos del suelo, estas también pueden romper los agregados del suelo formando agregados de menor tamaño (Six *et al.* citados por Cardona *et al.* 2016).



**Figura 11.** Porcentaje de agregados estables de un ultisol con planta, inoculado con *Bacillus subtilis* en concentraciones  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonia, bajo invernadero durante 120 días.

En los tratamientos sin planta, los porcentajes de agregados estables disminuyeron respecto al porcentaje de agregados estables inicial, previo a la inoculación con *B. subtilis* como ocurrió con los tratamientos con planta. Con excepción del tratamiento dos (T2) que equivale a  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia y el tratamiento cinco (T5) equivalente a  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias. El tratamiento dos presentó un incremento a los 30 días con 97.39 por ciento de agregados estables, sin embargo disminuyó hasta el final del estudio; el tratamiento cinco se mantuvo con valores cercanos al inicial hasta los 90 días donde aumentó hasta los 120 días con 97.2 por ciento de agregados estables (Figura 12).



**Figura 12.** Porcentaje de agregados estables de un ultisol sin planta, inoculado con *Bacillus subtilis* en concentraciones  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonia, bajo invernadero durante 120 días.

Los porcentajes de agregados estables en los tratamientos sin plantas son similares a los obtenidos en los tratamientos con planta; los porcentajes son superiores al 80 por ciento, a lo que se puede atribuir que durante el estudio este suelo no tuvo ningún disturbio como la acción mecánica de las raíces, ni aporte de materia orgánica y exudados por parte de las plantas.

Acosta y Ramírez (2010), obtuvieron un incremento en la estabilidad estructural de todos los tratamientos por la acción de *B. subtilis* haciendo referencia la propiedad de estos microorganismos para producir polisacáridos extracelulares que actúan como agentes cementantes de las partículas y su capacidad de participar en la descomposición de la materia orgánica (Bronick y Lal, citados por

Acosta y Ramírez 2010). Sin embargo, en la presente investigación, ocurrió lo contrario, disminuyó la estabilidad de agregados y los tratamientos no presentaron efectos significativos, por lo que se puede inferir que dicha disminución se relaciona con la baja actividad microbiana del suelo. Pues según Tisdall y Oades, citados por Cabria *et al.* (2002), cuando se reducen los aportes de origen orgánico al suelo se reduce la resistencia de los macro agregados al humedecimiento facilitando su ruptura y la formación de micro agregados.

La disminución del porcentaje de agregados estables tanto para tratamientos con planta como para tratamientos sin planta también puede deberse al contenido y aporte de materia orgánica. El ultisol estudiado provino de una parcela que no ha sido disturbada en los últimos años y que actualmente posee cobertura vegetal (pasto) a lo que puede atribuirse su alta estabilidad estructural inicial, este suelo debió tener contenidos de materia orgánica considerada como materia orgánica fresca y que según autores como Tisdall y Oades, citados por Cabria *et al.* (2002) determina una etapa inicial que incrementa los agentes cementantes asociados a su descomposición provocando un efecto benéfico en la formación de macro agregación.

Con el tiempo la continua descomposición y el no aportar materia orgánica al suelo, disminuye la frecuencia de la producción de agentes cementantes biológicos, condiciones que vuelven susceptibles a los macro agregados a fuerzas como el tamizado y humedecimiento fracturando los macro agregados y originando agregados de menor tamaño (Cabria *et al.* 2002).

## 5. CONCLUSIONES

- No hubieron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de bacterias de *B. subtilis*; sin embargo, ocurrieron cambios favorables entre los 30 y 60 días del estudio.
- La presencia de *B. subtilis* al inicio del experimento, provocó cambios relevantes en las concentraciones de pH y aluminio intercambiable a los 30 días, periodo en el cual hubo incremento del pH y disminución del aluminio intercambiable; sin embargo, este efecto no perdura en el tiempo a medida que la concentración bacteriana disminuye. En cuanto al fósforo, los cambios se relacionan con el incremento del pH al inicio del experimento y la tendencia del aluminio a incrementarse hasta el final del estudio.
- En la estabilidad de agregados, *B. subtilis* no provocó efectos estadísticos diferenciados. Se determinó que los porcentajes de agregados estables disminuyeron con respecto al porcentaje inicial tanto para tratamientos con planta como para tratamientos sin planta, lo que permite inferir que la ausencia de materia orgánica y actividad microbiana como *B. subtilis* produce cambios observables a corto plazo.

- Aunque no hubieron efectos significativos de las diferentes concentraciones de *B. subtilis* en la producción de materia seca de *V. sinensis*; se considera, que la tendencia al incremento de materia seca pudiera deberse a las condiciones favorables que se dieron entre los 30 y 60 días del estudio, que se reflejan en el ciclo fenológico de la planta.

## 6. RECOMENDACIONES

- Realizar un análisis de poblaciones de microorganismos del suelo, previo a la solarización, que permita reconocer los microorganismos endémicos y sus concentraciones y realizar el mismo análisis después del solarizado para determinar si el proceso cumplió totalmente con la desinfección o si existirá competencia para los microorganismos que serán inoculados.
- Se recomienda para futuras investigaciones, no solamente realizar la inoculación al suelo de bacterias promotoras de crecimiento vegetal sino también, aplicar biofertilizantes a base de fósforo y/o compost. Esto suministrará energía a las bacterias, promoviendo su proliferación e incrementando su capacidad solubilizadora de fósforo, de este modo se podrá lograr un incremento en la disponibilidad del elemento en el suelo.
- Aplicar al suelo inoculaciones combinadas, con microorganismos que realicen funciones sinérgicas entre sí, como por ejemplo, hongos que aporten sustancias ricas en carbono promoviendo el crecimiento poblacional de las bacterias y proporcionen un ambiente adecuado para el desarrollo de las mismas, por la acción de las hifas sobre la estructura del suelo.

## 7. REFERENCIAS

- Acosta Olayal, GE; Ramírez Pisco, R. 2010. Evaluación de los cambios en algunas propiedades físicas y químicas de un Ultisol por efecto de *Bacillus subtilis*. Revista Colombiana de Biotecnología 12(2).
- Arévalo de Gauggel, G; Castellano, M. 2009. Manual de Fertilizantes y Enmiendas. Programa para la Agricultura Sostenible en Laderas de América Central. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 57 p.
- Armenta Bojórquez, AD; García Gutiérrez, C; Camacho Báez, JR; Apodaca Sánchez, MA; Gerardo-Montoya, L; Nava Pérez, E. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai 6(1): 51-56.
- Bach Álvarez, T; Díaz, M. 2008. Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la Agricultura. XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología (XXIV RELAR) y I Conferencia Iberoamericana de Interacciones Beneficiosas Microorganismo-Planta-Ambiente (I IBEMPA) (24-1, 2009, Habana, Cuba). Habana, Cuba, ALAR- SEFIN. 38 p.
- Besoain, E. 1985. Mineralogía de arcillas de suelos. IICA, San José, Costa Rica. 1216 p.



Cabria, F; Calandroni, M; Monterubbianesi, G. 2002. Tamaño y estabilidad de agregados y su relación con la conductividad hidráulica saturada en suelos bajo labranza convencional y praderas. *Ciencia del Suelo* 20(2): 69-80.

Cañas Rodríguez, E. s.f. La bacteria *Bacillus subtilis* genera carbonatos de calcio o cal, sustancias que fortalecen el suelo: Microorganismo redentor del suelo. (en línea). Consultado el 15 de agosto de 2017. Disponible en <http://www.bioquirama.com/pdf/La-bacteria-Bacillus-subtilis.pdf>

Cardona, WA; Bolaños Benavides, MM; Chavarriaga Montoya, W. 2016. Efecto de fertilizantes químicos y orgánicos sobre la agregación de un suelo cultivado con *Musa acuminata* AA. (en línea). Consultado el 18 de julio de 2018. Disponible en [https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta\\_agronomica/rt/printerFriendly/4493/55924](https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/rt/printerFriendly/4493/55924)

Castro, L; Murillo, M; Uribe, L; Mata, R. 2015. Inoculación al suelo con *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum oryzae*, *Bacillus subtilis* y microorganismos de montaña (mm) y su efecto sobre un sistema de rotación soya-tomate bajo condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense* 39(3): 21-36.

Cerón Rincón, LE; Aristizábal Gutiérrez, FA. 2012. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14(1): 285-295.

- Chinchilla, M; Mata, R; Alvarado, A. 2011. Caracterización y clasificación de algunos ultisoles de la región de Los Santos, Talamanca, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 35(1): 59-81.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia). 1983. Guía de Estudio: Oxisoles y Ultisoles en América Tropical, I Distribución, importancia y propiedades Físicas. Salinas, JG; Valencia, CA (eds.). Cali, Colombia. 56 p. (Serie 04SP-02.03).
- CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, México). 2013. Estabilidad de los Agregados del Suelo Tamizado en Húmedo: Guía útil para comparar las prácticas de manejo de cultivo. 7 p.
- CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, México). 2014. Tamizado en Húmedo con tamices grandes. (en línea). Consultado el 15 de mayo de 2017. Disponible en [https://www.youtube.com/watch?v=VqUICyfh\\_Q8&t=18s](https://www.youtube.com/watch?v=VqUICyfh_Q8&t=18s)
- Cisneros-Rojas, CA; Sánchez-de Prager, MS; Menjivar-Flores, JC. 2017. Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana* 28(1): 149-158.
- Corrales Ramírez, LC; Sánchez Leal, LC; Arévalo Galvez, ZY; Moreno Burbano, VE. 2014. *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *NOVA* 12(21): 165-178.
- Cotrina Lobón, HL. 2009. Índice de estabilidad estructural de agregados en suelos ácidos, bajo dos sistemas de uso en el cultivo de cacao (*theobroma cacao*

l.). Tesis. Lic. Tingo María, Perú, Universidad Nacional Agraria De La Selva.  
72 p.

Cuervo, Lozada, JP. 2010. Aislamiento y Caracterización de *Bacillus spp* como Fijadores Biológicos de Nitrógeno y Solubilizadores de Fosfatos en Dos Muestras de Biofertilizantes Comerciales. Tesis Lic. Bogotá, Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. 28 p.

Espinosa, J; Molina, E. 1999. Acidez y encalado de los suelos. s. l. International Plant Nutrition Institute. 42 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Italia). 2015. Los suelos sanos son la base para la producción de alimentos saludables. (en línea). Consultado el 15 de agosto de 2017. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i4405s.pdf>

Fernández, MT. 2007. Fósforo: amigo o enemigo. ICIDCA (Sobre los derivados de la caña de azúcar) 41(2): 51-57.

Gill Espinosa, MM; Rueda Peña, PA; Salgado López, A; Varela Borja, AB. 2005. Guía de Uso de la Tecnología EM. Bogotá, Colombia, FUNDASES. 10 p.

Gisbert Blanquer, JM; Ibáñez Asensio, S; Moreno Ramón, H. s.f. Ultisoles. (en línea). Consultado el 20 de julio de 2017. Disponible en <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12868/Ultisoles.pdf?sequence=3>

- Gómez Giraldo, JC. 2013. Manual de prácticas de campo del laboratorio de suelos. Tolima, Colombia. 100 p.
- González Urías, MA. 2012. *Bacillus subtilis* como promotora del rendimiento y calidad de fresa. Tesis M.Sc. Jiquilpan, Michoacán, México, Instituto Politécnico Nacional. 121 p.
- Granda, E. s.f. Escala McFarland. (en línea). Consultado el 15 de sep. de 2017. Disponible en <https://docgo.org/practica-de-escala-mcfarland>
- Ibáñez, JJ. 2016. Microorganismos y la Estabilidad de los Agregados del Suelo. (en línea). Consultado el 10 de agosto de 2017. Disponible en <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2016/03/14/146893>
- IDIAP (Instituto de Investigación Agropecuario de Panamá). 2006. Zonificación de suelos de Panamá por niveles de nutrientes. (en línea). Consultado el 15 de julio de 2017. Disponible en <http://www.cich.org/Publicaciones/05/idiap-mapas-fertilidad.pdf>
- INTA (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, Costa Rica). 2016. Suelos de Costa Rica Orden Ultisol. 4 p.
- Llanos Machaca, MY. 2017. Bacterias solubilizadoras de fosfato del género *Bacillus* en suelos de la provincia de el Collao (Puno) y su efecto en la germinación y crecimiento de quinua (*Chenopodium quinoa willd.*) En condiciones de invernadero. Tesis. Lic. Puno, Perú, UNA. 89 p.

- López, G; Pérez J; Kleinn, C. 2000. SAS: Aplicaciones en el campo agropecuario y de los recursos naturales. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 128 p.
- López, E; Rodríguez, J; Tosquy, O. 2014. Producción de materia seca de frijol en cinco fechas de siembra durante el ciclo otoño-invierno en el norte de Veracruz (en línea). Consultado 15, oct. 2017. Disponible en: <http://132.248.9.34/hevila/RevistabiologicoagropecuariaTuxpan/2014/no3/40.pdf>
- Meza Pérez, E; Geissert Kientz, D. 2006. Estabilidad de estructura en Andisoles de uso forestal y cultivados. Terra Latinoamericana 24(2): 163-170.
- Morales T, SC. 2016. Cuantificación de las fracciones del fósforo total y disponibles en el suelo, en un sistema agroforestal de café arbolado, en la Finca Doña Amelia, Jaramillo Arriba, Distrito de Boquete, Provincia de Chiriquí. Tesis. Lic. Chiriquí, Panamá, UP, FCA. 81 P.
- Moreno R, ED. 2017. Evaluación del aporte de agua mediante polímeros hidroabsorbentes en cuatro órdenes de suelo (molisoles, ultisoles, alfisoles y andosoles), bajo ambiente controlado de invernadero, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, provincia de Chiriquí. Tesis, Lic. Chiriquí, Panamá, UP, FCA. 57 p.
- Moreno Ramón, H; Gisbert Blanquer, JM; Ibáñez Asensio, S. s.f. La Estructura de un Suelo. (en línea). Consultado el 17 de agosto de 2017. Disponible en <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/8010/estructura.pdf>

Morón, A; Martino, D; Sandwichik, J. Manejo y Fertilidad de Suelos. 1999. Montevideo, Uruguay, Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. 167 p.

Muhammad, T; Umaira, K; Muhammad I; Ghulam, MS; Muhammad, AN; Muhammad, S; Khalid M; Naveed, A; Fazal, K. 2018. 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. 2018. (en línea). Consultado el 31 de jul. De 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.11.005>

Munera Velez, GA; Meza Sepylveda, DC. s.f. El fósforo elemento indispensable para la vida vegetal. (en línea). Consultado el 6 de agosto de 2017. Disponible en <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/5248/el%20fosforo%20elemento.pdf?sequence=1>

Name, B; Villarreal, J. 2004. Compendio de Resultados de Investigación del Programa de Suelos del IDIAP: Estudio de suelos Ultisoles y Alfisoles realizados en las estaciones experimentales de Calabacito, Guarumal y Río Hato. Panamá, IDIAP. 206 p.

Núñez Solís, J. 2001. Manejo y Conservación de Suelos. Costa Rica, UNED. 288 p.

Oliva Escobar, DP. 2009. Determinación de la acidez intercambiable ( $Al^{3+}+H^{+}$ ) a partir del pH para la estimación de la capacidad de intercambio catiónico

(CIC) en suelos de la cuenca del Pacífico en El Salvador, Honduras y Nicaragua. Tesis. Lic. Honduras, Zamorano. 21 p.

Ovando Castellanos, DM. 2012. Respuesta fisiológica del frijol caupí (*vigna unguiculata* (L.) Walp) a la coinoculación de bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter* y *Rhizobium* en suelos del departamento del Cesar. Tesis. Magister. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 78 p.

Puente, ML; García, JE; Rubio, E; Peticari, A. 2010. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal empleados como inoculantes en trigo. INTA (116).

Samudio, A. 1994. Determinación del Fósforo en la Solución del Fósforo Fijado Utilizando la Isoterma de Adsorción de Langmuir. Chiriquí, Panamá, UP-FCA. 24 p.

Samudio, A. 1997. Solubilización del Fósforo por Microorganismos del Suelo. Chiriquí, Panamá, UP-FCA. 23 p.

Samudio, A. 1998. Guías de laboratorio: Fertilidad de suelos (EDA 435), Fertilidad y análisis (EDA 455). David, Panamá, Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 52 p.

Sánchez, PA. 1981. Suelos del Trópico: características y manejos. Camacho, E (trad.) San José, Costa Rica, IICA. 660 p.

Tejeira, R. s.f. La Acidez de los suelos de Panamá. (en línea). Consultado el 16 de julio de 2017. Disponible en

[http://www.up.ac.pa/ftp/2010/f\\_agropecuaria/documentos/INVT2.pdf](http://www.up.ac.pa/ftp/2010/f_agropecuaria/documentos/INVT2.pdf)

Tejera Hernández, B; Rojas Badía, MM; Heydrich Pérez, M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. CENIC (Ciencias Biológicas) 42(3): 131-138.

Torres Guerrero, CA; Etchevers B, JD; Fuentes Ponce, MH; Govaerts, B; De León González, F; Herrera, JM. 2013. Influencia de las raíces sobre la agregación del suelo. Terra Latinoamericana 31(1): 71-84.

UCR (Universidad de Costa Rica, Costa Rica). s.f.a. Determinación de pH en suelos (en línea). Consultado el 15 de mayo de 2017. Disponible en

<http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/LSF/20130520/Info%20pH.pdf>

UCR (Universidad de Costa Rica, Costa Rica). s.f.b. Determinación de acidez y aluminio intercambiable en suelos. (en línea). Consultado el 15 de mayo de 2017. Disponible en

<http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/LSF/20130520/Info%20Acidez%20y%20Al.pdf>

Venner Rodríguez, C; Martín Hernández, MJ. 2009. Aislamiento y Selección de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal en Cultivos de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) Con Capacidad Antagónica frente a *Fusarium* sp. Tesis. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. 61 p.



Villarreal, JE; Agudo, L; Villalaz, J. 2010. Clasificación de suelos de panamá y sus equivalencias. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 1 p.

## **8. ANEXOS**

**Anexo 1.** Metodología de estabilidad de agregados en húmedo adaptada del (CYMMIT 2013 y CIMMYT 2014).

### **Materiales**

- Tamices con maya con apertura de 4 mm, 2 mm, 0.250 mm, 0.106 mm y 0.075 mm.
- Recipientes de plástico de 5 de 30 cm de diámetro y 8 cm de altura.
- Una probeta de un litro (1000 ml).
- Agua destilada.
- Una piseta o botella lavadora.
- Bandejas de aluminio.
- Balanza.
- Cronómetro.
- Vaso de precipitado.
- Cucharas plásticas.
- Pinzas.
- Hoja de registro.

### **Procedimiento**

1. Colocar los tamices en los recipientes de plástico en orden de mayor a menor número de apertura de maya.

2. Agregar agua al tamiz de apertura de maya superior, hasta que la misma llegue a 1.5 cm de la parte inferior e interna del tamiz.
3. Pesar 50 gramos de suelo previamente secado al aire.
4. Distribuir la muestra de suelo equitativamente en el tamiz. Dejar remojar por 5 minutos (en este tiempo puede remover los residuos orgánicos flotantes utilizando las pinzas).
5. Luego tamizar las muestras por 2 minutos. En este tiempo debe moverse el tamiz lentamente con una pequeña inclinación de arriba hacia abajo que evitará que quede aire atrapado dentro de la maya.



6. Pasado los 2 minutos, lavar cuidadosamente la parte inferior del tamiz con agua destilada, procurando que el lavado caiga en el recipiente plástico.

7. Colocar el tamiz en un recipiente de aluminio y verter el material con ayuda de la piseta en el recipiente.



8. Transferir el agua y el suelo que quedaron del primer tamizado al siguiente tamiz.



9. Repetir el procedimiento del primer tamizado con los siguientes tamices.

10. Al culminar con el último tamiz de 0.075 mm, verter sin dejar de revolver con una cuchara, el suelo y el agua restante en una bandeja de aluminio.



11. Medir la cantidad de agua restante en una probeta de 1000 ml, anotar este dato para posteriormente calcular la fracción menor a 0.075 mm.



12. Pesar las bandejas de aluminio con agua y suelo, introducir las bandejas al horno a 105 °C por 18 a 24 horas y posteriormente pesar las bandejas con suelo seco.

### Cálculos

$$MWD = \sum_{i=1}^n < d_i > w_i$$

Donde:

**MWD** = diámetro medio ponderado (mm).

**d** = diámetro medio de cada fracción de tamaño *i* (mm) (por ejemplo, el suelo retenido en el tamiz de 1.00 mm tiene un diámetro máximo de 2.00 mm y uno mínimo de 1.00). Por tanto, el diámetro medio ponderado de ese tamiz es de 1.50 mm.

**w** = proporción del peso total de la muestra (g) al peso (g) de los fragmentos gruesos y de arena encontrados en la fracción de tamaño *i*.

**n** = número de fracciones.

### Hoja de cálculo

Tamiz (mm)	Peso del plato (g)	Peso del plato con suelo humedo (g)	Peso del plato con el suelo seco (g)	Peso del suelo (g)	Diámetro promedio del tamiz (d)	Porcentaje de la fracción del suelo	Proporción total de la muestra (w)	Diámetro medio ponderado.
4					6			
2					3			
0.25					1.125			
0.106					0.178			
0.075					0.0905			
0					0.0375			
Agua restante					Total del suelo de la muestra			

**Peso de las fracciones o peso del suelo**= Peso del suelo seco con plato – peso del plato

**Diámetro promedio (d):**

El diámetro máximo del tamiz de 4mm es de 4 y el mínimo es de 2 por lo que el diámetro medio del tamiz es 3.

**El total del suelo de la muestra es la sumatoria de todos los pesos de las fracciones o todos los pesos del suelo.**

**Porcentaje de la fracción del suelo**= (Peso del suelo / Total del suelo de la muestra) x 100

**Proporción total de la muestra (w)**= Peso del suelo/ peso total del suelo de la muestra

En el caso de la muestra representativa (0), se deben tomar en cuenta los siguientes parámetros:

- a) Relación suelo agua.
- b) Fracción total menor a 0.075 mm.
- c) Peso de la fracción.

**a) La relación suelo agua es igual a:**

Peso del suelo seco de la muestra representativa/ (Peso de la muestra representativa con agua – peso de la bandeja).

**b) Fracción total menor a 0.075 mm**

La fracción total menor a 0.075 mm= (Agua restante + diferencia entre el peso de la muestra representativa con agua y el peso de recipiente) x relación suelo agua.

**c) Peso de la fracción**

Peso de la fracción = fracción menor a 0.075 mm/ total del suelo de la muestra.



**Nota: Para la interpretación de los resultados, consultar lo descrito en las páginas 34 y 35 del presente documento.**