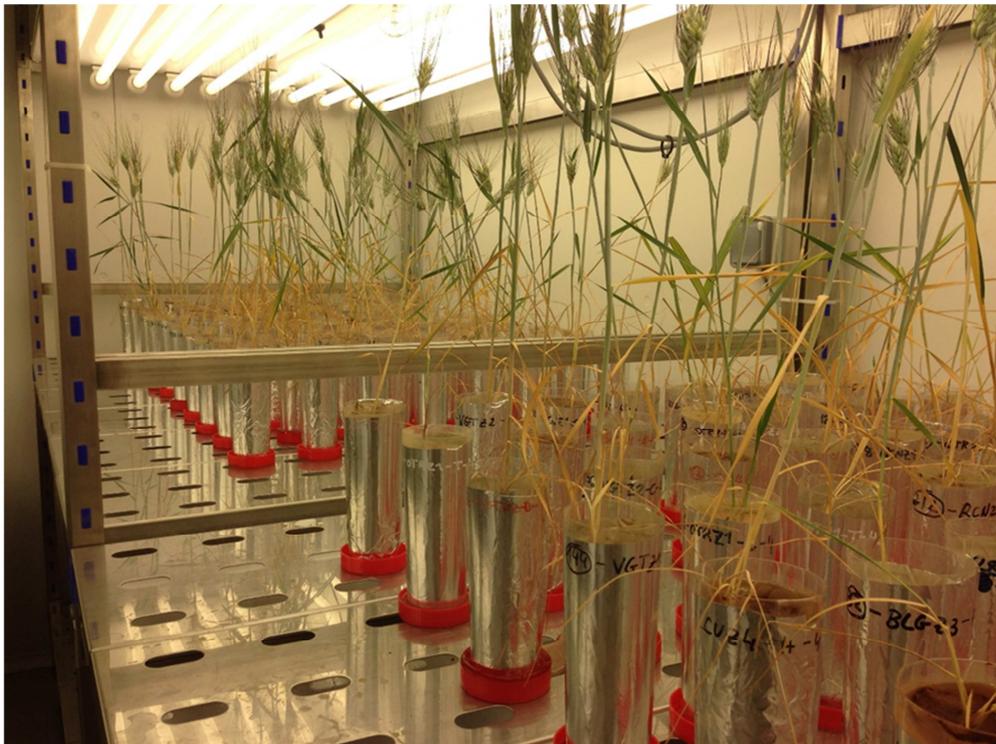


Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Grado en  
Ingeniería Agronómica

# Efecto de inoculaciones microbianas en la acumulación de Zn, P y otros micronutrientes

Universidad de Sevilla



Sevilla, 5 de septiembre de 2017

Alumno: Ángel Velasco Sánchez

Tutores: Antonio Delgado García y Aurora Moreno Lora



## ÍNDICE

Introducción.....	3
Objetivos.....	8
Materiales y métodos.....	9
Diseño experimental.....	9
Material vegetal.....	9
Medio de crecimiento.....	9
Condiciones de cultivo.....	12
Tratamientos.....	13
Análisis del suelo tras el cultivo.....	14
Análisis del material vegetal.....	16
Análisis estadístico.....	16
Resultados.....	18
Discusión.....	30
Conclusiones.....	33
Bibliografía.....	34



## Introducción

La deficiencia de Zn en suelo es una de las más comunes a nivel global, especialmente en suelos calcáreos de regiones áridas o semiáridas (Cakmak et al., 1999). Estos suelos se dan con frecuencia en regiones mediterráneas, siendo los países del mediterráneo oriental donde más frecuente es esta deficiencia. Los suelos mediterráneos suelen caracterizarse por tener un pH frecuentemente básico y un bajo contenido en materia orgánica (<1%). Todo esto contribuye a la reducción de la solubilidad de micronutrientes. La deficiencia de Zn pasa a menudo desapercibida por agricultores y consumidores (Rashid & Ryan, 2004). Otras deficiencias de micronutrientes son frecuentes en estos tipos de suelos. Tradicionalmente, a la que se ha prestado más atención no es al Zn, sino a la deficiencia de Fe, conocida como clorosis férrica o clorosis por deficiencia de Fe (de Santiago & Delgado, 2006).

Las deficiencias mencionadas pueden, no sólo reducir los rendimientos de las cosechas e incrementar los costes en abonos, sino que también pueden causar serios problemas para la salud (Prasad, 2012). En países subdesarrollados con dietas muy dependientes del trigo pueden desarrollarse enfermedades por la falta de Zn en la dieta (Cakmak et al., 1999). En suelos de la cuenca mediterránea, se considera la deficiencia de Zn como un problema serio que ocasiona pérdidas importantes en la producción y puede poner en riesgo la salud humana en algunos países del Norte de África o de Oriente Próximo (Rashid & Ryan, 2004). El incremento de la concentración de Zn y Fe en granos de cereal (sobre todo arroz y trigo), se considera un problema científico de primera magnitud para paliar las consecuencias en la salud humana de dietas basadas en el consumo de estos cereales. Esta búsqueda de mayores concentraciones de micronutrientes en grano, bien por manejo del cultivo (fertilización) o por mejora genética, se define como biofortificación.

Elevados niveles de fósforo en el suelo se asocian a la deficiencia de Zn y de Fe en los cultivos (Rashid & Ryan, 2004). El contenido en Zn en planta se reduce en condiciones en las que el P es abundante en el suelo debido a varios factores, entre ellos: reducción del transporte de las raíces a los brotes, reducción de la concentración en los tejidos debido a un mayor crecimiento de la planta (efecto dilución) y defectos en el metabolismo de la planta (Mousavi, 2011). El abonado con P ha contribuido a aumentar la producción agrícola en el último siglo. Sin embargo, un exceso en su

aplicación puede conllevar antagonismos nutricionales que pueden reducir la producción, disminuir la calidad de la cosecha para su consumo humano, y contribuir a la eutrofización del agua y dañar el medio ambiente (MacDonald et al., 2011). El efecto sobre la calidad se debe no sólo a los antagonismos que pueden reducir la concentración de Zn y Fe en la cosecha, sino al incremento en semillas del P almacenado como ácido fítico que reduce la absorción en el tracto digestivo de los elementos mencionados. Se ha intentado controlar la aplicación de abonos fosfatados mediante normativas en diversos países de la Unión Europea y en Estados Unidos. No obstante, a pesar de haberse reducido los excesos, todavía en áreas como el norte de Europa o la cuenca del Golfo de México los excesos de P y N son preocupantes. China es, con diferencia, el país donde más excesos de abonados se producen y en la actualidad no se han impuesto normativas estrictas para frenar dichos aportes (Vitousek et al., 2009).

En cuanto a salud se refiere, las deficiencias de Zn en la dieta humana empezaron a detectarse en los años 50 en países con dietas pobres en Zn como Irán y Egipto. Los efectos principales que presentan las personas con bajos niveles de ingesta de Zn pueden ser retraso mental, retraso del crecimiento en jóvenes y atrofia del aparato reproductor, entre otros. En casos severos, la deficiencia puede incluso producir la muerte (Prasad, 2012). Como se ha mencionado antes, los granos de trigo presentan un compuesto denominado ácido fítico que impide una buena asimilación del Zn en la digestión. Sin embargo, el ácido fítico presenta numerosas cualidades positivas para la salud humana como la inhibición de ciertos cánceres (Somasundar et al., 2017). Además, las semillas de trigo presentan los mayores contenidos de Zn en el embrión y en la capa aleurona (150 mg/kg). Como estas partes pueden perderse durante el proceso de molienda, se reduce significativamente el contenido en Zn en las harinas obtenidas (Cakmak, 2008). Estos aspectos hacen aún más severo el problema en comunidades con dietas poco variadas que dependen del cultivo de trigo, principalmente.

En aras de conseguir un correcto estado nutricional del cultivo y, por tanto, del consumidor, se han propuesto varias vías para incrementar el contenido de Zn y otros elementos en la planta y en concreto en los granos de cereal. Uno de ellos es la mejora y la selección genética de variedades más efectivas en la fijación (bioacumulación) de Zn (Rashid & Ryan, 2004). Varios autores han sugerido numerosas variedades más eficientes en la absorción de Zn (Khoshgoftarmanesh et al., 2009; Rengel & Graham, 1996). En la actualidad se están realizando esfuerzos para obtener mejores variedades

(White & Broadley, 2009) y se ha demostrado que las variedades silvestres de trigo acumulan mayores niveles de Zn, Fe y proteínas, además de resistir mejor las condiciones de sequía (Peleg et al., 2008). También, en la actualidad, cabe destacar el desarrollo de nuevas variedades a través de la transgenia (Zhu et al., 2007). Sin embargo, la mejora genética también presenta limitaciones. El problema radica en que los suelos que presentan condiciones de pH alto, baja humedad y bajo contenido en materia orgánica no contienen el suficiente Zn disponible para alcanzar los niveles deseados para el correcto desarrollo del cultivo (Cakmak, 2008). En general, se consideran deficitarios todos los suelos con contenidos inferiores a 0,5 mg/kg de Zn extraíble por DTPA (Lindsay & Norvell, 1978). Estas condiciones son frecuentes en los suelos en los que se cultivan cereales en áreas mediterráneas (Cakmak, 2008). Por lo tanto, la mejora genética se ve limitada en suelos que han agotado el Zn disponible (Cakmak, 2002). Esto se acentúa aún más en países subdesarrollados donde el uso de fertilizantes con micronutrientes en la agricultura es poco frecuente. En el caso de otros micronutrientes, y en particular del Fe, sus concentraciones en suelo suelen ser altas incluso en aquellos donde aparece la clorosis férrica. En este caso, el problema puede deberse a la escasa solubilidad de las formas dominantes de Fe en el suelo debido al pH básico y al fallo en especies sensibles de los mecanismos de movilización y translocación del nutriente en la planta (de Santiago & Delgado, 2006; de Santiago et al., 2008).

Los micronutrientes pueden aportarse como fertilizantes. El caso más habitual es aplicar Fe, generalmente como quelatos que son formas muy eficaces corrigiendo su deficiencia. Por el contrario, el Zn puede aplicarse directamente al suelo en diferentes formas químicas como  $ZnSO_4$  (más habitual y económica), ZnO, ZnEDTA o Zn oxisulfato (Cakmak, 2008). La aplicación de Zn puede hacerse, además de al suelo, a la semilla y/o a la hoja. Las aplicaciones foliares son las más eficientes incrementando el contenido en Zn tanto en granos como en tallos (Yilmaz et al., 1997). Sin embargo, el abonado directamente al suelo mejora la producción y es más rentable debido a su efecto residual (Yilmaz et al., 1997). Esto puede deberse a que cultivos como el trigo necesitan Zn, sobre todo, durante sus fases de crecimiento tempranas (Ozturk et al., 2006).

Las enmiendas orgánicas también pueden resultar interesantes, pues se ha demostrado que el aporte de restos del proceso de elaboración de aceite y de vino

incrementa el contenido en Zn disponible (Maqueda et al., 2015). También el uso de residuos sólidos urbanos, purines de aves y compost comercial incrementan los niveles de Zn disponible en suelos (Shuman, 1999). Estas enmiendas son efectivas incrementando parámetros de calidad del suelo, Un parámetro de calidad relevante es la actividad microbiana. Incrementos en la actividad microbiana dan lugar a mayores actividades enzimáticas en el suelo. Estas enzimas están directamente relacionadas con los ciclos y transformaciones de los nutrientes y varían rápidamente debido a alteraciones del suelo de origen natural o antropogénico (Puglisi et al., 2006). Dentro de las enzimas analizables de los suelos destacan, entre otras, las fosfatasas que se encargan de catalizar la hidrólisis de los enlaces fosfoéster liberando P al medio (Nannipieri et al., 2011), las  $\beta$ -glucosidasas que se implicadas en la hidrólisis de la celulosa del medio y convertirla en glucosa disponible para las plantas (Singhania et al., 2013) y las deshidrogenasas, encargadas de oxidar la materia orgánica transfiriendo protones y electrones del sustrato a aceptores (Makoi & Ndakidemi, 2008).

Para la supresión de enfermedades de las plantas se han utilizado microorganismos. Uno de los mecanismos para el control de enfermedades es competir con los patógenos por los nutrientes (Mercado-Blanco & Bakker, 2007). En el caso del Fe, esto se consigue secretando sideróforos (quelantes) que son compuestos muy efectivos en complejar selectivamente Fe y a veces otros metales (Sharma et al., 2003). Por consiguiente, también pueden resultar interesantes para incrementar la biodisponibilidad de ciertos metales, por ejemplo el aumento de Fe y Cu que se ha constatado en plantas de pepino (*Cucumis sativus*) usando *Trichoderma asperellum* strain T34 (de Santiago et al., 2013), Fe en soja (Sharma et al., 2003), Cu en maíz (Tao et al., 2003) y Zn y Mn en medios de cultivo en condiciones “in vitro” (Altomare et al., 1999).

*Trichoderma asperellum* T34 y *Bacillus subtilis* son usados para el control de enfermedades en plantas (Ongena & Jacques, 2008; de Santiago et al., 2013). De hecho, *B. subtilis* presenta un 4-5% de su genoma dedicado a la producción de antibióticos (Stein, 2005). *B. subtilis* se vende de forma comercial para combatir numerosas plagas en diferentes cultivos (Pérez-García et al. 2011). Al igual que en el caso de *Trichoderma*, *Bacillus* puede considerarse un biofertilizante (Pérez-García et al., 2011). Especies de *Bacillus* secretan al medio fitasa que actúa sobre los complejos formados por el fitato (una de las formas orgánicas de P más abundantes en el medio natural)

liberando metales que estaban unidos a él como  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  y haciéndolos disponibles para las plantas (Jorquera et al. 2008). También pueden reducir el  $Fe^{3+}$ , muy difícil de asimilar por las plantas (Pérez-García et al., 2011), a  $Fe^{2+}$ , el cual es absorbido con mayor facilidad por la planta (Valencia-Cantero et al., 2007). Además, *B. subtilis* produce citoquininas que estimulan el crecimiento de las plantas en condiciones adversas (Arkhipova et al., 2007). Adicionalmente se ha demostrado que los ácidos orgánicos volátiles secretados por *B. subtilis* promueven el crecimiento de las plantas como *Arabidopsis thaliana* a través de la homeostasis de las auxinas y el crecimiento celular (Zhang et al., 2007).

Por lo tanto, el uso de biofertilizantes como el caso de *T. asperellum* o *B. subtilis* y la aplicación de materia orgánica lábil que favorezca el desarrollo de los microorganismos del suelo, puede suponer una herramienta novedosa para conseguir una buena nutrición en los cultivos sin comprometer el medio ambiente y que pueda combinarse con los avances realizados en la mejora vegetal.

## Objetivos

En relación con lo anteriormente expuesto, este estudio pretende identificar los posibles efectos positivos de la aplicación de microorganismos como biofertilizantes (*Trichoderma asperellum* y *Bacillus subtilis*) y de la materia orgánica (celulosa) en la absorción de Zn y otros micronutrientes (Cu, Fe y Mn) así como en su interacción con el P en plantas de trigo duro (*Triticum durum*), en suelos con diferentes propiedades químicas y físicas.

## **Materiales y métodos**

### **Diseño experimental**

El experimento se distribuyó en bloques al azar considerándose 3 factores: i) suelo, ii) tratamiento y iii) nivel de Zn, con 4 repeticiones por cada combinación. Se utilizaron 5 tipos de suelos diferentes, cada uno de ellos con nivel alto y bajo de Zn, hasta un total de 10 suelos. Los tratamientos realizados fueron: inoculaciones de *Trichoderma asperellum* T34 y *Bacillus subtilis* QST710, aplicación celulosa y un testigo sin tratar. Cada repetición consistió en una maceta con una planta de trigo duro (*Triticum durum*).

$$10 \text{ suelos} \times 4 \text{ tratamientos} \times 4 \text{ repeticiones} = 160 \text{ macetas}$$

### **Material vegetal**

Se utilizaron plantas de trigo duro (*Triticum durum*), cuyas semillas fueron previamente tratadas con una pequeña dosis de NaClO diluido en agua esterilizada al 5%, esto se realizó para eliminar posibles contaminaciones. A continuación, se introdujeron las semillas en cámara frigorífica para inducir la germinación a través de vernalización. Durante este periodo las semillas continuaron siendo humedecidas con agua esterilizada con NaClO diluido al 5% hasta su germinación.

### **Medio de crecimiento**

Las plántulas fueron cultivadas en un medio de perlita y tras alcanzar el estadio Z1.3 de la escala Zadoks (Zadoks et al., 1974) se procedió al trasplante. Las plántulas fueron lavadas con agua para eliminar la perlita adherida a las raíces y se introdujeron en macetas cilíndricas con un volumen de 350 cm<sup>3</sup>, cada una con 300 g del suelo correspondiente (los datos de los suelos vienen recogidos en la Tabla 1 y 2). En el momento del trasplante se aplicaron 5 mL de agua a una profundidad media de la maceta y 20 mL de agua sobre la superficie del suelo.

Para la extracción de los suelos primero se identificaron tipos de suelos homogéneos en parcelas diferentes, a continuación, se realizó un muestreo en diferentes puntos de las parcelas para conseguir un rango de variación en el Zn extraíble por DTPA. De dichos suelos se estimaron índices de biodisponibilidad para la planta, se realizaron extracciones con DTPA (ácido penténico) para el Zn, Mn, Cu y Fe (Lindsay & Norvell, 1978) y el método Olsen para la extracción del P (Olsen, 1954) como puede observarse en la tabla 2.

Tabla 1. Datos de los suelos analizados.

ID suelo	Nivel Zn	P CaCl2 (mg P/kg)	Carbono orgánico %	pH	Carbonatos %	CE ds/m	Arcilla %	Limo %	Arena %	Carbono %
BLG	b	0,25	0,49	8	23,1	0,397	10,8	22	45	0,49
	a	0,09	0,51	8,4	15,3	0,132	11,6	25,3	47,5	0,51
LCV	b	0,07	0,74	8	3,2	0,163	38,5	10,2	48,4	0,74
	a	0,25	0,74	8,09	4,4	0,178	38,7	13,5	42,6	0,74
OTR	b	0,003	0,32	8,68	17,4	0,116	38,3	18,4	26,4	0,32
	a	0,04	1,08	8,44	15	0,197	35,5	19,1	31,1	1,08
RCN	b	0,17	0,55	6,6	no	0,055	16,2	4,3	76,7	0,55
	a	1,66	0,55	7,1	no	0,132	17	4,1	79,4	0,55
VGT	b	0,72	0,58	8,3	1,62	0,119	9,2	10	81	0,58
	a	0,92	0,58	7,7	no	0,102	12,7	8,9	78,7	0,58

a= nivel alto de Zn b= nivel bajo de Zn

Tabla 2. Valores de biodisponibilidad de los suelos analizados

Suelo	Nivel Zn	P mg/kg suelo	Zn mg/kg suelo	Fe mg/kg suelo	Cu mg/kg suelo	Mn mg/kg suelo
BGL	b	21,85	0,19	3,23	1,84	3,19
	a	5,79	0,2	3,16	0,8	3,05
LCV	b	7,64	0,27	6,13	4,04	7,14
	a	12,7	0,35	1,78	1,97	7,48
OTR	b	4,23	0,08	4,7	0,22	4,77
	a	5,34	0,31	6,08	0,36	7,67
RCN	b	8,01	0,29	13,7	5,4	6,61
	a	18,4	0,46	10,2	12,94	8,3
VGT	b	18,66	0,22	5,99	0,39	8,3
	a	22,03	0,34	9,7	0,52	8,21

a= nivel alto de Zn b= nivel bajo de Zn

Zn, Fe, Cu y Mn extraíbles por DTPA (Lindsay & Norwell, 1978)

### Condiciones de cultivo

El semillero de perlita fue saturado con agua desionizada e introducido en una de las cámaras de cultivo de la Escuela Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Sevilla. La cámara fue programada con las siguientes condiciones climáticas: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, 25°C de temperatura durante las horas de luz y 18°C durante las horas de oscuridad, humedad relativa del 40% durante las horas iluminadas y 60% de humedad durante las horas sin luz y la radiación fotosintética aportada fue de 300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ . Todas estas condiciones se escogieron para simular las condiciones naturales de crecimiento.

Tras el trasplante, las macetas fueron colocadas aleatoriamente en la cámara de cultivo con las mismas condiciones climáticas anteriormente descritas. Se regaron con agua desionizada y con solución Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) modificada sin P ni Zn (Tabla 3) a demanda de la planta tal y como se indica en la Tabla 4. El total de solución nutritiva Hoagland fue de 560 ml por maceta y el total de H<sub>2</sub>O fue de 255 ml por maceta.

**Tabla 3. Composición de la solución nutritiva Hoagland**

Nutriente	Concentración (mmol/L)
MgSO <sub>4</sub>	2
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5
KNO <sub>3</sub>	5
KCl	0,05
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,024
MnCl <sub>2</sub>	0,0023
CuSO <sub>4</sub>	0,0005
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.0005

**Tabla 4. Calendario de riego y volúmenes de disolución nutritiva aportada**

Semana	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
1	25 ml a	10 ml b	10 ml b	35 ml b	30 ml b		
2	30 ml a		10 ml b	20 ml b	20 ml b		30 ml b
3	20 ml a		20 ml b		20 ml b		30 ml a
4	15 ml b		30ml b		30 ml b		30 ml b
5		40 ml a *			30 ml b		
6	40 ml a		30 ml b		50 ml b		
7	30 ml b		30 ml a		40 ml b		
8	35 ml b		35 ml b		40 ml a		

a= H<sub>2</sub>O esterilizada b= Solución nutritiva Hoagland \*= 2ª aplicación de celulosa

## Tratamientos

### 1. Inóculo de *Trichoderma asperellum*

Las plántulas destinadas al tratamiento con *T. asperellum* fueron inoculadas por inmersión, con una concentración de 10<sup>3</sup> conidias/mL Además, tras el trasplante, se aportó en superficie 10<sup>4</sup> conidias/g de suelo regando con una suspensión en agua de 1,5x10<sup>3</sup> conidias/mL en 4 puntos diferentes de la superficie del suelo (de Santiago et al., 2009). El proveedor fue Biocontrol Technologies.

## 2. Inóculo de *Bacillus subtilis*

En el caso de *B. subtilis*, la inoculación se realizó con  $2 \times 10^4$  CFU/g de suelo de *B. subtilis* que se aplicaron regando con una suspensión de inóculo en agua de 20 mL a una concentración de  $3 \times 10^5$  CFU/mL en 4 puntos diferentes de la superficie del suelo (García-López & Delgado, 2016). El proveedor fue Bayer Cropscience.

## 3. Aporte de celulosa

En cuanto a la celulosa, se realizaron dos aplicaciones de 100 mg C/kg de suelo cada una, la primera se llevó a cabo una vez realizado el trasplante aplicando en 4 puntos diferentes de la superficie del suelo una solución con la celulosa disuelta en 20 mL de agua (en el mismo volumen de agua usado para inocular los microorganismos) y la segunda aplicación se llevó a cabo al inicio del espigado, estadio Z5.1 (Zadoks et al., 1974; de Santiago et al., 2013). La riqueza de la celulosa era de 0,44 g C/g celulosa.

## Análisis del suelo tras el cultivo

Se separó el suelo rizosférico, el adherido a las raíces, del resto y se almacenaron por separado. Se procedió a realizar los siguientes análisis a los suelos de cada maceta.

### 1. Ácidos orgánicos

Se determinó la concentración de ácidos orgánicos en suelo rizosférico mediante High Performance Liquid Chromatography HPLC (Gao, 2012) previa extracción con NaOH (0,01M) en relación 1:1 p/v.

### 2. Plating

Para comprobar la presencia de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma asperellum* en los suelos inoculados, se realizó un plating al final del ciclo de cultivo. La determinación de *Bacillus subtilis* se realizó en un medio de cultivo semi-selectivo según Zhao et al (2011). En el caso de *Trichoderma asperellum* se contabilizó siguiendo el método de Chung & Hoitink (1990). La presencia de microorganismos quedó

confirmada en los medios que habían recibido inóculo. No se detectaron unidades formadoras de colonias (CFU) en los medios que no recibieron inóculo.

### 3. Actividades enzimáticas

Se analizaron los niveles de fosfatasa,  $\beta$ -glucosidasa y deshidrogenasa según los procedimientos de Tabatabai (1994).

- Fosfatasa: Se pesaron 2 g de suelo (control y dos repeticiones de cada muestra) y se le añadieron 4 ml de buffer universal (MUB) y 1 ml de p-nitrophenilfosfato (PNP). La muestra se agitó y se dejó incubar al baño maría durante 1 hora a 37°C. Transcurrido ese tiempo se paró la reacción añadiendo 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M y 4 ml de NaOH 0,5 M. Posteriormente se midió mediante espectrofotometría visible a 410 nm. Se determinó la cantidad de p-nitrophenilfosfato (PNP). Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g PNP/g suelo h}$ .
- $\beta$ -glucosidasa: Se midió la actividad mediante la incubación de 0,5 g de suelo, a 37°C durante 60 minutos, con 4 mL de buffer universal (MUB) a pH 6 y 1 mL de 0,05 M p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside (PNG). Tras 60 minutos se adicionaron 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0,5 M) y 4 mL de solución extractora de 0,1 M p-nitrophenol (THAM) a pH 12. Se filtró con papel Whatman n° 2 y se midió mediante espectrofotometría visible a 410 nm para determinar la cantidad de p-nitrophenol formado. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g PNG/g suelo h}$ .
- Deshidrogenasa: Se analizó la actividad deshidrogenasa mediante la incubación, a 37°C durante 24 horas, de 2 g de suelo, a los que se les añadió; 0,0335 g de  $\text{CaCO}_3$ , 0,5 mL de 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) al 3% y 1,75 mL de agua millipore. Pasadas las 24 horas de incubación, se añadieron 7,75 mL de etanol y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Se repitió el mismo procedimiento 2 veces más, añadiendo 10 mL de etanol en lugar de 7,75 y obteniéndose un volumen total de 30 mL de etanol. Se determinó la formación de 1,3,5-Triphenyltetrazolium formazán (TPF) a través de la medida en espectrofotometría visible a 485 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g TPF/g suelo h}$ .

#### 4. Sideróforos

Para la cuantificación de sideróforos (queladores) se siguió el método propuesto por Schwyn & Neilands (1987) previa extracción con NaOH 0,1 M, en una relación 1:1 de p/v.

#### Análisis del material vegetal

Tras finalizar el ciclo y sacarse las macetas de la cámara de cultivo, las plantas fueron desprendidas del suelo y se separaron y pesaron por separado raíz y parte aérea. Las raíces fueron introducidas en un baño de ultrasonidos para eliminar contaminaciones. El material vegetal se introdujo en estufa a 65°C dentro de sobres de papel individuales durante al menos 48 horas para desecar por completo los tejidos. Tras esto, se separaron los granos de la parte aérea y se volvieron a pesar por separado. El material vegetal se molió finamente (tamaño de partícula inferior a 1 mm) para luego introducirse en hornos mufla a 550°C durante 8 horas para ser calcinado. A continuación, se procede a disolver la ceniza resultante en 10 mL de 1 N HCl. En la disolución resultante, se determinaron Zn, Fe, Cu y Mn mediante espectrometría de absorción atómica (Thermo Fisher C3100) y el P mediante colorimetría siguiendo el método de Murphy and Riley (1962).

#### Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) en bloques al azar con tres factores. Previamente se comprobó la distribución normal de datos y la homogeneidad de la varianza con los test de Smirnov-Kolmogorov y Cochran, respectivamente. En caso de no cumplir estos requisitos los datos se transformaron mediante transformación logarítmica o potencial. Si el efecto de los factores principales era significativo, se realizó la comparación de medias mediante el test LSD ( $P < 0,05$ ). Si la interacción de factores es significativa, el efecto de los factores principales no puede discutirse, ya que su efecto depende del nivel del otro factor. En tal caso, se realizó un análisis del efecto (ANOVA) para la combinación de los dos factores y una comparación de medias

mediante el test mencionado anteriormente. También se realizaron regresiones para estudiar las posibles relaciones entre variables. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Statgraphis Centurion XVI (Statpoint 2013).

## Resultados

La producción de biomasa, en concreto la materia seca de grano y tallo, fue afectada significativamente por los tratamientos (Tabla 5). Es la celulosa la que tanto en grano como en tallo mejora la materia seca con respecto al testigo. En el caso del tallo también *B. subtilis* mejora la biomasa respecto al testigo sin tratar de manera estadísticamente representativa. *T. asperellum* no dio lugar a diferencias significativas respecto al testigo sin inocular. Lo mismo ocurre con el número de granos (Tabla 6). Podemos ver claramente el efecto que producen dichos tratamientos en las Figuras 1, 2 y 3. Por el contrario, los tratamientos no tuvieron efectos significativos sobre parámetros nutricionales de la planta (Tabla 7).

En cuanto a los efectos de los tratamientos en las propiedades bioquímicas del suelo, sí hemos observado efectos significativos de los tratamientos sobre actividades enzimáticas en la rizosfera (glucosidasa y fosfatasa) y Fe complejado por sideróforos (Tabla 5).

A este respecto, podemos resaltar el efecto significativo de los tratamientos de *T. asperellum* y de celulosa ya que aumentan la actividad enzimática en el suelo (glucosidasa y fosfatasa) respecto al testigo y en mayor medida que *B. subtilis* (Tabla 8). Por el contrario, la adición de celulosa al suelo reduce la cantidad de Fe complejado por sideróforos.

Tabla 5. Análisis de la varianza de parámetros de biomasa y bioquímicos del suelo (valor de P)

Fuente de variación	MS tallo	MS raiz <sup>1</sup>	MS grano	Nº grano	Ácido oxálico	Deshidrogenasa <sup>2</sup>	β-Glucosidasa <sup>3</sup>	Fosfatasa <sup>4</sup>	Sideróforos
A: Suelo	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
B: Tratamiento	0,0094	0,2094	0,0477	0,2103	0,0801	0,7716	0,0001	0,0283	0,0051
C: Nivel de Zn	0,0000	0,0557	0,0002	0,0299	0,9290	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015
INTERACCIONES									
AB	0,0150	0,2214	0,3553	0,1172	0,6916	0,0000	0,0026	0,0008	0,0026
BC	0,7396	0,0267	0,6375	0,5997	0,0492	0,3862	0,6974	0,5308	0,1252

<sup>1</sup> Transformada Dato<sup>0.17</sup> para cumplir requisitos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homodasticidad (Cochran)

<sup>2</sup> Transformada Dato<sup>-0.356</sup> para cumplir requisitos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homodasticidad (Cochran)

<sup>3</sup> Transformada Dato<sup>-0.388</sup> para cumplir requisitos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homodasticidad (Cochran)

<sup>4</sup> Transformada Dato<sup>0.11</sup> para cumplir requisitos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homodasticidad (Cochran)

MS= materia seca

Tabla 6. Efecto del tratamiento en valores de biomasa

Tratamiento	MS tallo		MS grano		N° granos	
	Promedio	Error Estándar	Promedio	Error Estándar	Promedio	Error Estándar
B	0,97	± 0,04 a	0,39	± 0,02 ab	11,65	± 0,63 ab
C	1,00	± 0,03 a	0,42	± 0,02 a	12,70	± 0,56 a
H	0,95	± 0,03 ab	0,37	± 0,02 ab	11,95	± 0,44 ab
T	0,92	± 0,04 b	0,39	± 0,02 b	11,23	± 0,62 b

Medias separadas con letras que indican grupos homogéneos diferentes (LSD)

MS expresada en g

B, *B. subtilis*, C, celulosa, H, *T. asperellum* y T, testigo

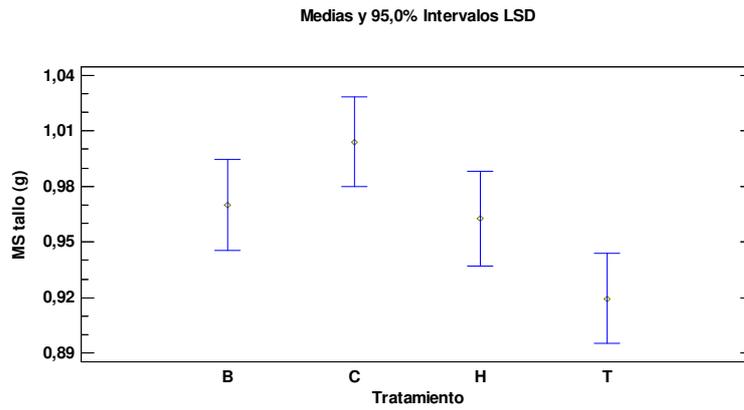


Figura 1. Efecto del tratamiento sobre el peso seco del tallo en gramos. B, *B. subtilis*, C, celulosa, H, *T. asperellum* y T, testigo. Barras indican error estándar.

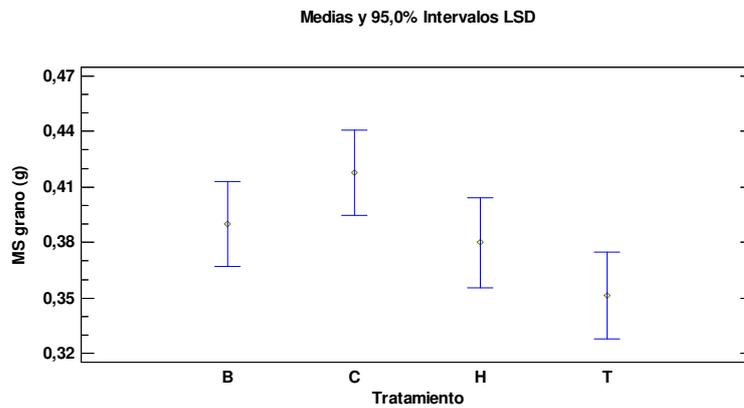


Figura 2. Efecto del tratamiento sobre el peso seco del grano en gramos. B, *B. subtilis*, C, celulosa, H, *T. asperellum* y T, testigo. Barras indican error estándar.

Tabla 7. Análisis de la varianza de parámetros de concentración de nutrientes en grano y nutrientes totales en planta (valor de P)

Fuente de variación	[Fe] grano <sup>1</sup>	[Cu] grano	[Mn] grano	[Zn] grano	[P] grano <sup>2</sup>	Fe planta <sup>3</sup>	Cu planta <sup>4</sup>	Mn planta <sup>5</sup>	Zn planta <sup>6</sup>	P planta <sup>7</sup>	Zn grano/ Zn planta <sup>8</sup>	Fe grano/ Fe planta <sup>9</sup>
A: Suelo	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
B: Tratamiento	0,7063	0,5865	0,3950	0,7024	0,0994	0,5351	0,6021	0,5869	0,5257	0,9921	0,1023	0,8481
C: Nivel de Zn	0,7382	0,9945	0,0008	0,1638	0,0067	0,0212	0,6936	0,0006	0,0000	0,3892	0,5634	0,9215
INTERACCIONES												
AB	0,4505	0,4930	0,1970	0,2949	0,2864	0,2178	0,5202	0,0120	0,0836	0,3745	0,1222	0,1999
BC	0,3460	0,1655	0,2401	0,0442	0,3602	0,0044	0,4577	0,0012	0,0003	0,0068	0,0394*	0,1108

<sup>1 2 3 5 9</sup> Transformación logarítmica (base 10) para cumplir requisitos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homodasticidad (Cochran)

<sup>4</sup> Transformada Dato<sup>-0,231</sup> para cumplir requisitos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homodasticidad (Cochran)

<sup>6</sup> Transformada Dato<sup>0,09</sup> para cumplir requisitos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homodasticidad (Cochran)

<sup>7</sup> Transformada Dato<sup>-0,138</sup> para cumplir requisitos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homodasticidad (Cochran)

<sup>8</sup> Se elimina interacción ABC para mejorar el valor de P, al ser la interacción ABC no significativa

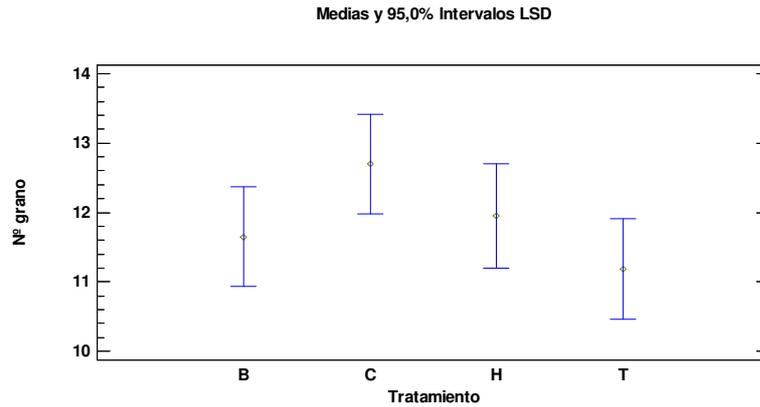


Figura 3. Efecto del tratamiento sobre el número de granos. B, *B. subtilis*, C, celulosa, H, *T. asperellum* y T, testigo. Barras indican error estándar

Tabla 8. Efecto del tratamiento en valores bioquímicos del suelo

Tratamiento	Glucosidasa		Fosfatasa		Sideróforos	
	Promedio	Error Estándar	Promedio	Error Estándar	Promedio	Error Estándar
B	121,71	± 1,7 b	186,86	± 3,85 ab	0,0134	± 0,0003 a
C	124,91	± 1,7 a	199,88	± 3,78 a	0,0118	± 0,0003 b
H	124,93	± 1,7 a	196,52	± 3,78 a	0,0131	± 0,0003 a
T	117,42	± 1,7 b	186,38	± 3,78 b	0,0134	± 0,0003 a

Medias separadas con letras que indican grupos homogéneos diferentes (LSD)

B, *B. subtilis*, C, celulosa, H, *T. asperellum* y T, testigo

Glucosidasa expresada en µg PNG/g suelo h

Fosfatasa expresada en µg PNP/g suelo h

Sideróforos expresados en µg (Fe 3+) complejados por sideróforos/g suelo

Las actividades enzimáticas presentan además relaciones lineales positivas entre ellas como se puede ver en los Figuras 4 y 5.

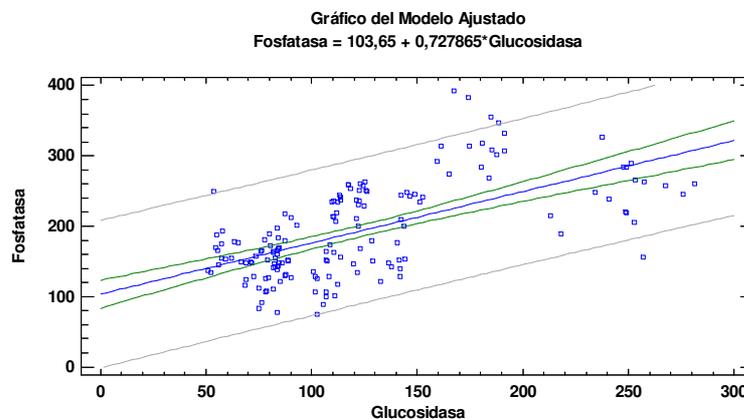


Figura 4. Relación lineal entre fosfatasa y glucosidasa.  $P=0$   $R^2=37,69\%$

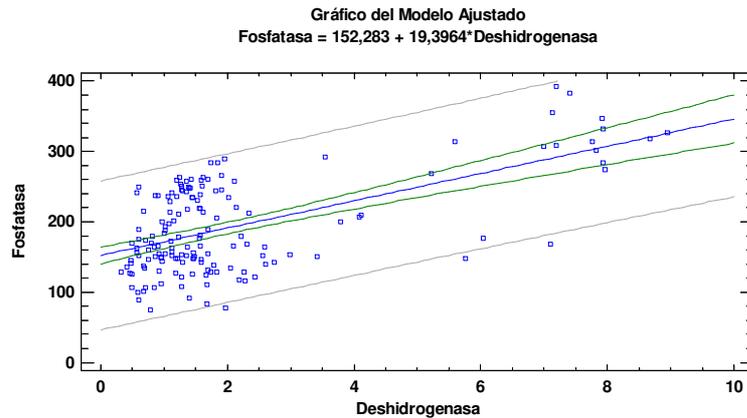


Figura 5. Relación lineal entre fosfatasa y deshidrogenasa.  $P=0$   $R^2=37,78\%$

Se han estudiado además otras relaciones lineales como entre valores de biomasa (raíz seca) y bioquímicos del suelo (Fe complejo por sideróforos) (Figura 6). También entre valores de concentración de nutrientes (P en planta) y actividad enzimática (fosfatasa) (Figura 7).

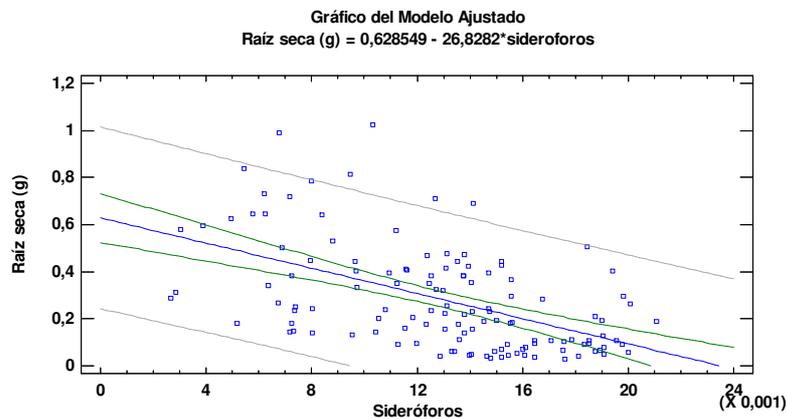


Figura 6. Relación lineal entre raíz seca y sideróforos.  $P=0$   $R^2=27,9\%$

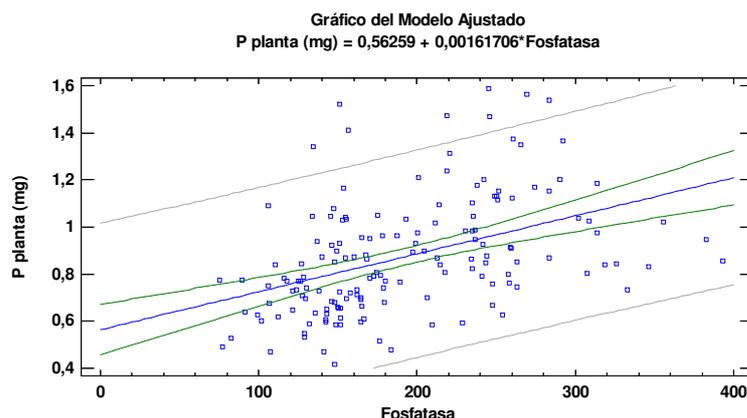


Figura 7. Relación lineal entre P en planta y fosfatasa.  $P=0$   $R^2=18,86\%$

El contenido en Fe complejo por sideróforos en el suelo disminuye con el peso seco de las raíces. En el caso de la Figura 7 podemos ver como al aumentar los niveles de fosfatasa en el suelo también aumenta el contenido total de P en la planta.

En general, no se observa efecto positivo alguno de los inoculantes o la celulosa en la concentración de P en la planta (Tablas 7 y 9).

Tabla 9. Efecto del tratamiento en valores de concentración de nutrientes

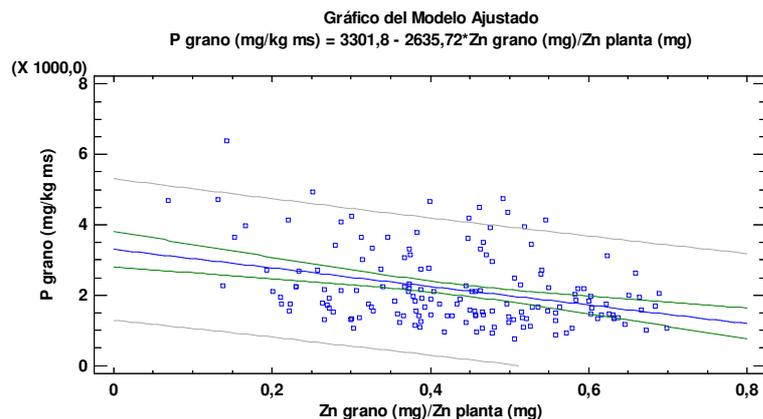
Tratamiento	Concentración de P en grano		Relación Zn en grano / Zn en planta	
	Promedio	Error Estándar	Promedio	Error Estándar
B	2116,05	± 156,7 ab	0,45	± 0,02 a
C	1960,46	± 131,57 b	0,44	± 0,02 a
H	2091,21	± 139,69 ab	0,43	± 0,02 ab
T	2523,09	± 217,86 a	0,40	± 0,02 b

Medias separadas con letras que indican grupos homogéneos diferentes (LSD)

B, *B. subtilis*, C, celulosa, H, *T. asperellum* y T, testigo

Concentración de P en grano expresada en mg/kg

Se aprecia que los tratamientos mejoran en general la relación Zn grano/Zn planta (Tabla 9). Entre los tratamientos destaca la celulosa que es la que más disminuye la concentración de P y la que más aumenta la relación Zn grano/Zn planta. El tratamiento con *B. subtilis* mejora también esta relación, pero no reduce la concentración de P con respecto al testigo de manera significativa. *T. asperellum* no mejoró significativamente la relación Zn grano/Zn planta respecto al testigo (Tabla 9). La relación entre la relación Zn grano/Zn planta decrece linealmente con la concentración de P en grano, como se puede apreciar en la Figura 8.



**Figura 8. Relación lineal entre la retranslocación de Zn al grano y concentración de P en grano.  $P=0$   
 $R^2=12,12\%$**

Además de los efectos del tratamiento antes expuestos, existen efectos significativos de las interacciones entre el suelo y el tratamiento y entre el tratamiento y el nivel de Zn en algunas de las variables estudiadas. Estos efectos significativos de las interacciones pueden observarse en las Tablas 5 y 7. Estas interacciones implican que los efectos de los tratamientos dependan del suelo en el que se apliquen (Tabla 10). Podemos determinar que en el caso de la deshidrogenasa los suelos que mejor se comportan son LCV y OTR, en el caso de la glucosidasa RCN y VGT, en el caso de la fosfatasa OTR y VGT, en el caso de los sideróforos OTR y en el caso del Zn total en planta RCN. Los suelos que peor se comportan son RCN para deshidrogenasa y para sideróforos, BLG para glucosidasa y fosfatasa y LCV para Zn total en planta y fosfatasa.

Los tratamientos que más aumentan las medias en los suelos más favorables son:

- Fosfatasa: Celulosa en OTR y *T. asperellum* en VGT.
- Glucosidasa: Celulosa en RCN y *T. asperellum* en VGT.
- Deshidrogenasa: *T. asperellum* en RCN y el testigo en LCV, los tratamientos disminuyen la actividad.
- Zn total en planta: Celulosa en RCN.

En términos generales, podemos decir que los tratamientos con *T. asperellum* y celulosa son los que mayor actividad enzimática y niveles de Zn en planta promueven, esto contrasta con los tratamientos con *B. subtilis* cuyo efecto no es tan notorio e incluso a veces es negativo.

Hubo una interacción significativa entre tratamiento y nivel de Zn en el suelo en algunas de las variables estudiadas (Tablas 5 y 7). Podemos resaltar los efectos sobre la acumulación de Zn en planta que tienen los tratamientos de *B. subtilis*, celulosa y *T. asperellum* en suelos con nivel alto en Zn, en los que aumentan el contenido con respecto al testigo. Sin embargo, *T. asperellum* reduce el contenido en suelos con bajos niveles en Zn, de manera estadísticamente significativa. El testigo no presenta variación entre los suelos con niveles altos y bajos de Zn (Figura 9; Tabla 11).

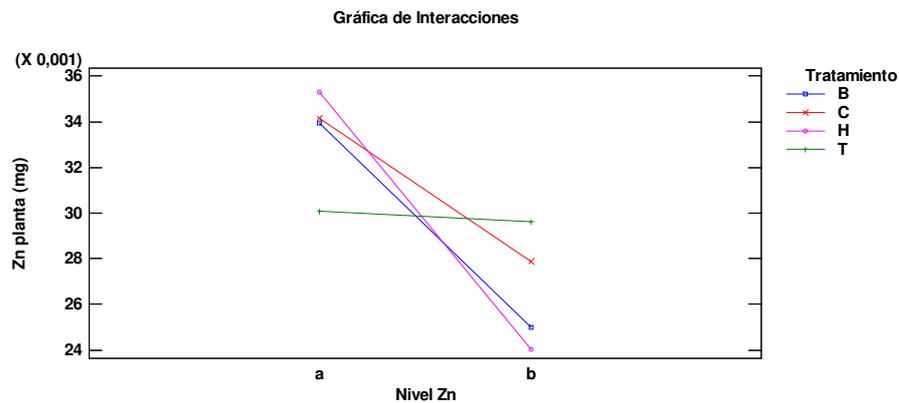


Figura 9. Gráfica de interacción entre nivel de Zn en suelo y tratamiento para el Zn total en planta

Tabla 10. Efecto del tratamiento en función de cada suelo

Suelo	Tratamientos	Deshidrogenasa		Glucosidasa		Fosfatasa		Sideróforos		Zn planta	
BLG	B	1,60	± 0,14 abcdef	84,46	± 3,80 gh	165,19	± 10,44 cde	0,0144	± 0,0021 abc	0,0367	± 0,0038 abc
	C	1,11	± 0,09 defg	86,84	± 3,25 fgh	147,81	± 6,42 de	0,0121	± 0,0018 cde	0,0348	± 0,0036 bcd
	H	1,96	± 0,17 abcde	79,59	± 2,89 h	157,74	± 11,51 de	0,0112	± 0,0014 def	0,0333	± 0,0035 cde
	T	1,12	± 0,12 efg	79,55	± 2,10 h	156,90	± 8,14 de	0,0150	± 0,0016 abc	0,0336	± 0,0040 cde
LCV	B	3,54	± 1,00 abcd	105,00	± 10,34 defgh	145,30	± 8,73 de	0,0135	± 0,0003 abcd	0,0176	± 0,0016 i
	C	1,97	± 0,21 abcde	106,62	± 8,62 cdefgh	130,74	± 8,98 e	0,0130	± 0,0004 bcd	0,0224	± 0,0019 fghi
	H	2,14	± 0,18 abc	112,47	± 10,73 bcdefgh	146,31	± 5,06 de	0,0151	± 0,0007 abcd	0,0180	± 0,0019 hi
	T	2,68	± 0,45 ab	104,86	± 10,77 defgh	144,86	± 19,12 e	0,0136	± 0,0005 abc	0,0189	± 0,0026 ghi
OTR	B	3,99	± 1,29 abcdef	115,20	± 23,42 efg	233,63	± 26,12 ab	0,0160	± 0,0006 ab	0,0250	± 0,0044 fghi
	C	4,15	± 1,22 abc	118,62	± 23,51 defgh	263,95	± 36,63 a	0,0162	± 0,0009 a	0,0250	± 0,0029 efg
	H	4,68	± 1,32 a	129,24	± 24,60 bcdefgh	241,01	± 28,85 ab	0,0167	± 0,0008 a	0,0231	± 0,0039 fghi
	T	3,41	± 1,07 abcde	118,77	± 23,32 defgh	236,45	± 30,36 ab	0,0166	± 0,0007 a	0,0247	± 0,0030 efg
RCN	B	1,20	± 0,25 fg	183,90	± 30,12 a	162,88	± 22,84 de	0,0095	± 0,0013 ef	0,0474	± 0,0025 ab
	C	1,25	± 0,22 defg	182,80	± 26,52 a	214,59	± 23,26 abc	0,0059	± 0,0009 g	0,0519	± 0,0026 a
	H	0,86	± 0,20 g	172,28	± 26,67 ab	192,25	± 20,12 bcd	0,0096	± 0,0011 ef	0,0461	± 0,0048 abc
	T	1,20	± 0,19 defg	171,23	± 27,47 abc	162,25	± 26,54 de	0,0083	± 0,0010 fg	0,0457	± 0,0042 abc
VGT	B	1,18	± 0,11 cdefg	119,97	± 2,16 abcdef	225,29	± 9,04 ab			0,0028	± 0,0028 fghi
	C	1,49	± 0,10 abcdef	129,65	± 5,20 abcde	242,30	± 5,43 ab			0,0034	± 0,0034 fghi
	H	1,24	± 0,11 cdef	131,07	± 5,53 abcd	245,30	± 3,92 a			0,0034	± 0,0034 cdef
	T	1,26	± 0,08 bcdef	112,67	± 3,49 abcdefg	231,44	± 7,18 ab			0,0020	± 0,0020 defg

Medias separadas con letras que indican grupos homogéneos diferentes (LSD). B, *B. subtilis*, C, celulosa, H, *T. asperellum* y T, testigo

Deshidrogenasa expresada en µg TPF/g suelo h. Glucosidasa expresada en µg PNG/g suelo h. Fosfatasa expresada en µg PNP/g suelo h.

Sideróforos expresados en µg (Fe 3+) complejados por sideróforos/g suelo. Zn planta expresado en g

Tabla 11. Efecto del tratamiento en función del nivel de Zn

Nivel de Zn	Tratamientos	Zn planta	P planta	Relación Zn grano/ Zn planta
Alto	B	0,0339 ± 0,0031 a	0,918 ± 0,071 ab	0,418 ± 0,032 ab
	C	0,0342 ± 0,0026 a	0,831 ± 0,051 ab	0,420 ± 0,033 ab
	H	0,0337 ± 0,0027 a	0,933 ± 0,069 ab	0,447 ± 0,036 ab
	T	0,0301 ± 0,0030 b	0,900 ± 0,075 ab	0,420 ± 0,034 ab
Bajo	B	0,0250 ± 0,0030 ab	0,844 ± 0,035 ab	0,473 ± 0,027 a
	C	0,0279 ± 0,0035 ab	0,912 ± 0,040 a	0,469 ± 0,022 a
	H	0,0240 ± 0,0029 b	0,768 ± 0,037 b	0,419 ± 0,033 ab
	T	0,0301 ± 0,0030 ab	0,887 ± 0,051 ab	0,372 ± 0,031 b

Medias separadas con letras que indican grupos homogéneos diferentes (LSD)  
 B, *B. subtilis*, C, celulosa, H, *T. asperellum* y T, testigo  
 Zn planta y P planta expresados en g.

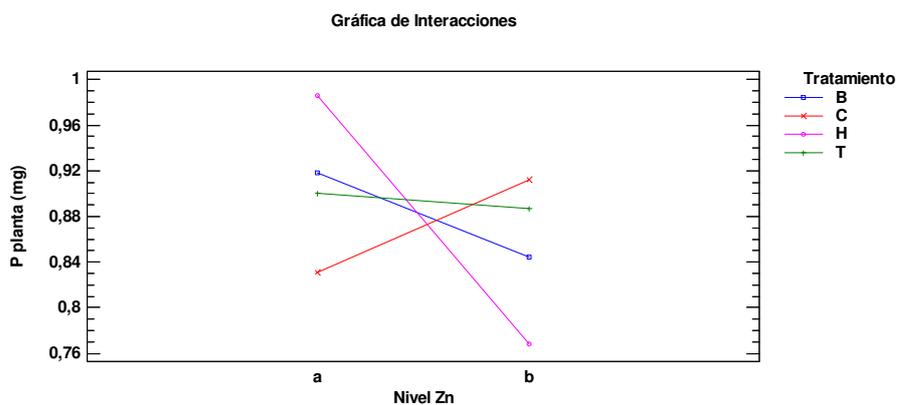
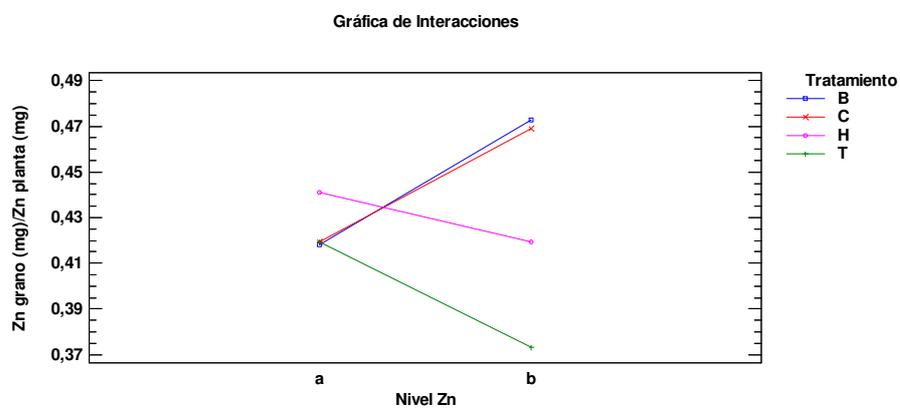


Figura 10. Gráfica de interacción para el nivel de Zn en suelo y el tratamiento para P total en planta.

En cuanto a la relación Zn grano/Zn planta se observan incrementos estadísticamente significativos con los tratamientos de celulosa y *B. subtilis* en suelos

bajos en Zn. Respecto al resto de tratamientos, no se detectaron diferencias significativas (Figura 11).



**Figura 11. Gráfica de interacción para el nivel de Zn en suelo y tratamiento para la relación Zn grano/Zn planta.**

## Discusión

La inoculación con *B. subtilis* y la aplicación de celulosa incrementó la materia seca de los tallos de las plantas de trigo respecto al testigo sin tratamiento. Además, la celulosa también incrementó la producción de grano, mientras que los incrementos obtenidos con *B. subtilis* y T34 no fueron significativamente distintos del testigo sin tratamiento. Esto indica que la inoculación con ciertos microorganismos o el incremento de la actividad microbiana del suelo que se puede conseguir con la aplicación de enmiendas orgánicas, que en nuestro caso se simulan con la aplicación de celulosa, pueden tener efectos positivos en el desarrollo y producción de los cultivos. Por el contrario, la concentración de nutrientes en las plantas no se mejoró con estos tratamientos. Esto puede deberse a un efecto de dilución en los tejidos de la planta, al aumentar la biomasa en tallo y grano y el número de granos mediante los tratamientos no se consigue aumentar la concentración de nutrientes en la planta. Es bien conocido que la concentración de nutrientes a lo largo del ciclo de cultivo disminuye al aumentar la acumulación de biomasa (Villalobos y Fereres, 2017). Esto puede resultar particularmente evidente si la disponibilidad de un nutriente en el suelo es limitada. El efecto de mejora en la producción de biomasa o grano no parece necesariamente relacionado con mejoras en la acumulación total de un nutriente, ya que en este caso el efecto de los tratamientos depende esencialmente del nivel de Zn en el suelo. Este efecto positivo podría explicarse por el efecto que los microorganismos del suelo pueden tener en la producción de sustancias fisiológicamente activas (García-López et al., 2015).

Otro aspecto remarcable es el hecho de que los tratamientos que aumentan la relación Zn grano/Zn planta también reducen la concentración de P en el grano. El aumento de la relación mencionada implica un aumento en el índice de cosecha de este nutriente. Éste es un efecto positivo ya que de alguna manera contribuye a aumentar el efecto biofortificante. La relación negativa entre Zn grano/Zn planta y la concentración de P en grano puede poner de manifiesto que el antagonismo entre el Zn y el P puede ser debido a la interacción del P en el movimiento de Zn en la planta. Entre las propiedades que están afectadas por la interacción de los tratamientos y el tipo de suelo está la concentración de sideróforos en la rizosfera. No se puede distinguir entre la producción de sideróforos por la planta (las gramíneas como el trigo la producen) o los

microorganismos, pero se sabe que también pueden afectar la acumulación de Zn. Hay una relación negativa entre la concentración de sideróforos y la materia seca de raíz. Una explicación plausible sería que cuando los medios son menos limitantes para la planta, al tener una mayor disponibilidad de micronutrientes, las plantas se desarrollan mejor y hay menos necesidad de secretar sustancias que movilicen estos nutrientes, lo que conlleva un gasto energético.

El factor que mayor efecto tiene sobre los parámetros estudiados es el suelo. Sin embargo, los suelos también influyen en los efectos de los tratamientos como ponen de manifiesto muchas de las interacciones descritas. Esto puede deberse a las diferencias en las propiedades químicas y físicas que presentan cada uno de los cinco suelos estudiados. En general, no se puede establecer una propiedad del suelo en concreto que explique estos resultados. Esto parece indicar que es un conjunto de propiedades del suelo que afectan la geoquímica y disponibilidad de los nutrientes la que explica el diferente efecto que los tratamientos relacionados con la actividad microbiana tienen dependiendo del tipo de suelo. La interacción entre tratamientos y tipo de suelo en las actividades enzimáticas pueden revelar un diferente efecto de inoculación y enmienda en parámetros relacionados con la actividad microbiana dependiendo del tipo de suelo, bien sea por sus propiedades fisicoquímicas o porque las poblaciones de microorganismos autóctonas pueden afectar el establecimiento de los inóculos.

Las relaciones de la fosfatasa con la deshidrogenasa y con la  $\beta$ -glucosidasa revelan que la primera actividad está influenciada por la actividad microbiana en el suelo, ya que las otras actividades están asociadas a microorganismos del suelo. Por tanto, parece que los microorganismos afectan positivamente la actividad hidrolítica del P orgánico, que se sabe contribuye al suministro de P para las plantas (Recena et al., 2015). Esto contribuye a explicar la relación positiva observada entre el P en la planta y la actividad fosfatasa en la rizosfera.

Existen interacciones entre el nivel de Zn en el suelo y los tratamientos en parámetros que son relevantes desde un punto de vista de nutrición de la planta y que afectan a la calidad nutricional del grano. Los tratamientos aumentan el contenido en Zn en la planta en mayor medida en aquellos suelos con altos niveles en Zn. En promedio, la inoculación con los dos microorganismos o la aplicación de celulosa aumenta un 20 % la acumulación de Zn total en la planta cuando los niveles de Zn son altos. Por el

contrario, el efecto parece negativo a niveles bajos del nutriente, en particular para *B. subtilis* y para T34, lo que quizás pone de manifiesto cierto efecto de competencia en la adquisición de Zn cuando los niveles de disponibilidad son bajos en el suelo (Marschner et al. 2011). Sin embargo, en aquellos suelos con niveles bajos, los tratamientos mejoran la acumulación de Zn en el grano respecto al que se acumula en la planta en su conjunto, en particular *B. subtilis* y celulosa, que mejoran el índice de cosecha de Zn (Zn grano/Zn planta) en un 30 %. Por tanto, aunque en condiciones de mayor limitación de disponibilidad de Zn en el suelo hay una menor absorción de Zn por la planta, la proporción de Zn que se acumula en el grano es mayor con estos tratamientos. Esto revela cierto efecto en el transporte de Zn al grano que resulta positivo en términos nutricionales. Curiosamente, existe también, una interacción sobre el P en la planta. Resulta particularmente claro en el efecto de T34, positivo con niveles altos de Zn, y negativo con niveles bajos. Esto revela, que los potenciales efectos de los inoculantes microbianos sobre el Zn o el P no se pueden contemplar de manera aislada, y que la interacción entre ambos nutrientes puede condicionar el efecto de dichos inoculantes.

## Conclusiones

Los tratamientos de *B. subtilis*, *T. asperellum* y celulosa no incrementaron el contenido en nutrientes en la planta mientras que sí dieron lugar a una mayor producción de biomasa en tallo y grano y del número de granos. El efecto de los tratamientos en las actividades enzimáticas en la rizosfera y en la nutrición de las plantas está condicionado sobre todo por las propiedades del suelo, pero también por el nivel de Zn del suelo. En los suelos con niveles altos en Zn, la inoculación con microorganismos y la celulosa aumentó el Zn total en la planta, mientras que en los suelos con niveles bajos de Zn los tratamientos con celulosa y *B. subtilis* aumentan de manera significativa la acumulación de Zn en el grano respecto al resto de la parte aérea.

## Bibliografía

- Altomare, C., Norvell, W. A., & Harman, G. E. (1999). Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. *Appl Environ Microbiol* 65, 65(7), 2926–2933.
- Arkhipova, T. N., Prinsen, E., Veselov, S. U., Martinenko, E. V., Melentiev, A. I., & Kudoyarova, G. R. (2007). Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil*, 292(1–2), 305–315. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9233-5>
- Cakmak, I. (2002). Plant nutrition research : Priorities to meet human needs for food in. *Plant and Soil*, 247, 3–24. <https://doi.org/10.1023/a:1021194511492>
- Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant and Soil*, 302(1–2), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9466-3>
- Cakmak, I., Kalayci, M., Ekiz, H., Braun, H. J., Kiling, Y., & Yilmaz, A. (1999). Zinc deficiency as a practical problem in plant and human nutrition in Turkey: A NATO-science for stability project. *Field Crops Research*, 60(1–2), 175–188. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(98\)00139-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(98)00139-7)
- Chung, Y. R., & Hoitink, H. A. J. (1990). Interactions Between Thermophilic Fungi and *Trichoderma hamatum* in Suppression of *Rhizoctonia* Damping-Off in a Bark Compost-Amended Countainer Medium. *The American Phytopathological Society*, 80(1), 73–77.
- de Santiago, A., & Delgado, A. (2006). Predicting Iron Chlorosis of Lupin in Calcareous Spanish Soils from Iron Extracts. *Soil Science Society of America Journal*, 70, 1945–1950. <https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0343>
- de Santiago, A., García-López, A. M., Quintero, J. M., Avilés, M., & Delgado, A. (2013). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.06.020>

- de Santiago, A., Quintero, J. M., Avilés, M., & Delgado, A. (2009). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron nutrition in white lupin. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 2453–2459. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.07.033>
- de Santiago, A., Quintero, J. M., & Delgado, A. (2008). Long-term effects of tillage on the availability of iron, copper, manganese, and zinc in a Spanish Vertisol. *Soil and Tillage Research*, 98(2), 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.still.2008.01.002>
- Gao, Z. (2012). Evaluation of different kinds of organic acids and their antibacterial activity in Japanese Apricot fruits. *African Journal of Agricultural Research*, 7(35), 4911–4918. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.1347>
- García-López, A. M., Avilés, M., & Delgado, A. (2015). Plant uptake of phosphorus from sparingly available P- sources as affected by *Trichoderma asperellum* T34. *Agricultural and Food Science*, 24(3), 249–260.
- García-López, A. M. & Delgado, A. (2016). Effect of *Bacillus subtilis* on phosphorus uptake by cucumber as affected by iron oxides and the solubility of the phosphorus source. *Agricultural and Food Science*, 25(3), 216-224.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station, 347(2nd edit), 32 pp.
- Jorquera, M., Martínez, O., Maruyama, F., Marschner, P., & de la Luz Mora, M. (2008). Current and Future Biotechnological Applications of Bacterial Phytases and Phytase-Producing Bacteria. *Microbes and Environments*, 23(3), 182–191. <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.182>
- Khoshgoftarmanesh, A. H., Sadrarhami, A., Sharifi, H. R., Afiuni, D., & Schulin, R. (2009). Selecting zinc-efficient wheat genotypes with high grain yield using a stress tolerance index. *Agronomy Journal*, 101(6), 1409–1416. <https://doi.org/10.2134/agronj2009.0103>
- Lindsay, W. L., & Norvell, W. A. (1978). Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 421–428. <https://doi.org/10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x>
- MacDonald, G. K., Bennett, E. M., Potter, P. A., & Ramankutty, N. (2011). Agronomic

- phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3086–3091.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1010808108>
- Makoi, J. H. J. R., & Ndakidemi, P. a. (2008). Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology*, 7(3), 181–191.  
<https://doi.org/10.5897/AJB07.590>
- Maqueda, C., Morillo, E., Lopez, R., Undabeytia, T., & Cabrera, F. (2015). Influence of organic amendments on Fe, Cu, Mn, and Zn availability and clay minerals of different soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61(5), 599–613.  
<https://doi.org/10.1080/03650340.2014.946409>
- Marschner, P., Crowley, D., & Rengel, Z. (2011). Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis - model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 883–894.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.01.005>
- Mercado-Blanco, J., & Bakker, P. A. H. M. (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: Exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 92(4), 367–389. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9167-1>
- Mousavi, S. R. (2011). Zinc in Crop Production and Interaction with Phosphorus. *Soil Science*, 5(9), 1503–1509.
- Murphy J, & Riley JP. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemistry ACTA*, 27, 31–36.  
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). Phosphorus in Action, 26, 215–243. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9>
- Olsen, S. R. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. United States Department Of Agriculture; Washington.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

- Ozturk, L., Yazici, M. A., Yucel, C., Torun, A., Cekic, C., Bagci, A., ... Cakmak, I. (2006). Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. *Physiologia Plantarum*, 128(1), 144–152. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00737.x>
- Peleg, Z., Saranga, Y., Yazici, A., Fahima, T., Ozturk, L., & Cakmak, I. (2008). Grain zinc, iron and protein concentrations and zinc-efficiency in wild emmer wheat under contrasting irrigation regimes. *Plant and Soil*, 306(1–2), 57–67. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9417-z>
- Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Prasad, A. S. (2012). Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2–3), 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.04.004>
- Puglisi, E., Del Re, A. A. M., Rao, M. A., & Gianfreda, L. (2006). Development and validation of numerical indexes integrating enzyme activities of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1673–1681. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.11.021>
- Rashid, A., & Ryan, J. (2004). Micronutrient Constraints to Crop Production in Soils with Mediterranean-type Characteristics: A Review. *Journal of Plant Nutrition*, 27(6), 959–975. <https://doi.org/10.1081/PLN-120037530>
- Recena, R., Torrent, J., Campillo, M. C., & Delgado, A. (2015). Accuracy of Olsen P to assess plant P uptake in relation to soil properties and P forms. *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 35). <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0332-z>
- Rengel, Z., & Graham, R. D. (1996). Uptake of zinc from chelate-buffered nutrient solutions by wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 47(2), 217–226. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.2.217>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

- Sharma, A., Johri, B. N., Sharma, A. K., & Glick, B. R. (2003). Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry*, 35(7), 887–894. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00119-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00119-6)
- Shuman, L. M. (1999). Organic Waste Amendments Effect on Zinc Fractions of Two Soils. *Journal of Environmental Quality*, 28, 1442–1447. <https://doi.org/10.2134/jeq1999.00472425002800050008x>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>
- Somasundar, P., Riggs, D. R., Jackson, B. J., Cunningham, C., Vona-Davis, L., & McFadden, D. W. (2017). Inositol Hexaphosphate (IP6): A Novel Treatment for Pancreatic Cancer<sup>1</sup>. *Journal of Surgical Research*, 126(2), 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.01.022>
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Tabatabai, M. A. (1994). Soil Enzymes. In *Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties* (pp. 775–833). Madison, WI: Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c37>
- Tao, S., Chen, Y. J., Xu, F. L., Cao, J., & Li, B. G. (2003). Changes of copper speciation in maize rhizosphere soil. *Environmental Pollution*, 122(3), 447–454. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00313-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00313-5)
- Valencia-Cantero, E., Hernández-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., López-Meza, J. E., Alfaro-Cuevas, R., & López-Bucio, J. (2007). Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant and Soil*, 291(1–2), 263–273. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9191-y>
- Villalobos, F. J. & Fereres, E. (2017). *Principles of Agronomy for Sustainable Agriculture*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319->

- Vitousek, P. M., Naylor, R., Crews, T., David, M. B., Drinkwater, L. E., Holland, E., , P. J. Johnes, J. Katzenberger, L. A. Martinelli, P. A. Matson, G. Nziguheba, D. Ojima, C. A. Palm, G. P. Robertson, P. A. Sanchez, A. R. Townsend & Zhang, F. S. (2009). Nutrient Imbalances in Agricultural Development. *Science*, 324(5934), 1519–1520. <https://doi.org/10.1126/science.1170261>
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in. *New Phytologist*, 182(1), 49–84. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02738.x>
- Yilmaz, A., Ekiz, H., Torun, B., Gultekin, I., Karanlik, S., Bagci, S. A., & Cakmak, I. (1997). Effect of different zinc application methods on grain yield and zinc concentration in wheat cultivars grown on zinc deficient calcareous soils. *Journal of Plant Nutrition*, 20(4–5), 461–471. <https://doi.org/10.1080/01904169709365267>
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., & Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14(6), 415–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>
- Zhang, H., Kim, M.-S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, Farag, M. A., Ryu, C. M., Allen, R., Melo, I. S., Paré, P. W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226(4), 839. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0530-2>
- Mohamed A. Farag · Choong-Min Ryu · Randy Allen ·  
Itamar S. Melo · Paul W. Paré
- Zhao, Q., Shen, Q., & Ran, W. (2011). Inoculation of soil by *Bacillus subtilis* Y-IVI improves plant growth and colonization of the rhizosphere and interior tissues of muskmelon ( *Cucumis melo* L . ), 507–514. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0558-0>
- Zhu, C., Naqvi, S., Gomez-Galera, S., Pelacho, A. M., Capell, T., & Christou, P. (2007). Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. *Trends in Plant Science*, 12(12), 548–555. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.09.007>