

Análisis y caracterización de poblaciones bacterianas solubilizadoras de P en un ensayo de larga duración con diferentes secuencias de cultivo

MARCELA L. RÖRIG¹✉; ANALÍA M. RODRÍGUEZ¹; ILEANA FRASIER¹; LORENA SETTEN¹; EDIT OTERO ESTRADA¹; MARIANA SOLANS²; JOSÉ M. SCERVINO² & DANIEL H. GRASSO¹

¹Instituto de Suelos, CIRN, CNIA - INTA. ²INIBIOMA, CONICET, UNComahue.

RESUMEN. Se conoce bien que diferentes sistemas de uso y manejos de suelos afectan la abundancia, la actividad y la composición de la comunidad microbiana del suelo. En este trabajo se estudió el comportamiento de las poblaciones bacterianas cultivables y, en particular, las bacterias solubilizadoras de P (BSP) en muestras de suelo provenientes de un ensayo de larga duración con diferentes secuencias de cultivo. Los resultados obtenidos ponen en evidencia que el desmonte y el uso agrícola posterior luego de 11 años generó una disminución de la población de bacterias cultivables en general, y de las bacterias solubilizadoras de P en particular, con respecto al suelo prístino. Se obtuvieron aislamientos con una alta eficiencia de solubilización de P de los suelos provenientes de las diferentes rotaciones. Estos aislamientos eficientes se clasificaron taxonómicamente mediante análisis 16S RNA como pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. En particular, la caracterización de los sobrenadantes de cultivos de los aislamientos *Pseudomonas koreensis* y *Paenibacillus pabuli* mostraron que son productoras de ácidos orgánicos. Los ensayos de inoculación combinada de estas dos cepas sobre plantas de maíz en cámara de cultivo pusieron de manifiesto un efecto sinérgico sobre la promoción del crecimiento de esta especie. Los resultados aquí presentados sugieren que si bien las poblaciones de BSP son más numerosas en suelos prístinos, determinadas rotaciones de cultivos a largo plazo favorecen el incremento de bacterias solubilizadoras más eficientes, un aspecto que debería tenerse en cuenta al diseñar futuras estrategias de búsqueda de potenciales bioinoculantes.

[Palabras clave: rotación de cultivos, biofertilizantes, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*]

ABSTRACT. Analysis and characterization of P-solubilizing bacterial populations in a long-term field experiment with different crop sequences. It is well known that different soil use and management systems affect the abundance, activity and composition of the soil microbial community. In this work, the behavior of cultivable bacterial populations and, in particular, P (PSB) solubilizing bacteria in soil samples from a long-term trial with different culture sequences was studied. The results obtained show that the clearing and subsequent agricultural use after 11 years generated a decrease in the population of cultivable bacteria in general, and of P-solubilizing bacteria in particular, with respect to the pristine soil. Isolates with high P solubilization efficiency were obtained from the soils from the different rotations. These efficient isolates were taxonomically classified by 16S RNA analysis as belonging to the genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. In particular, the characterization of the culture supernatants of the isolates *Pseudomonas koreensis* and *Paenibacillus pabuli* showed they are producers of organic acids. The combined inoculation tests of these two strains on maize plants in a culture chamber revealed a synergistic effect on the growth promotion of this species. The results presented here suggest that although PSB populations are more numerous in pristine soils, certain long-term crop rotations favor the increase of more efficient solubilizing bacteria, an aspect that should be considered when designing future search strategies for potential bioinoculants.

[Keywords: crop rotation, biofertilizers, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*]

INTRODUCCIÓN

La expansión de la frontera agrícola en la provincia de Santiago del Estero se ha intensificado en las últimas décadas debido al reemplazo del bosque nativo por sistemas más simplificados orientados a una agricultura de monocultivos (Baldassini et al. 2020). A este proceso de agriculturización también se le suma el manejo inadecuado de las tierras, la intensidad y la estacionalidad de las lluvias y el clima semiárido, lo cual conduce a la degradación y la erosión de los suelos (Ferrerías et al. 2007; Revelli et al. 2010). Por ello, resulta muy importante aprovechar en estos ambientes los recursos naturales de acuerdo a su aptitud y fomentar la adopción de prácticas de manejo sustentables. Con este enfoque, el uso de microorganismos nativos seleccionados por sus propiedades funcionales y adaptados a las condiciones ambientales constituye una alternativa eficiente y sustentable para optimizar la producción de los cultivos (Pérez-Montaño et al. 2014). Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) son un grupo de bacterias que colonizan de manera activa las raíces vegetales y aumentan su crecimiento y rendimiento. Los mecanismos que utilizan para promover el crecimiento de las plantas no se comprenden en su totalidad, pero se pueden clasificar en cuatro grupos según Grover et al. (2021): biofertilizantes (i.e., solubilización de fosfatos minerales, fijación asimbiótica de N_2), fitoestimuladores (i.e., capacidad de producir fitohormonas), rizorremediadores (i.e., contaminantes orgánicos degradantes) y bioplaguicidas (i.e., producción de sideróforos, síntesis de antibióticos, enzimas y compuestos fungicidas). Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) desempeñan un papel fundamental en el ciclo biogeoquímico del P en el suelo. Tienen la capacidad de solubilizar y mineralizar P de las reservas inorgánicas y orgánicas del suelo, respectivamente, a través de la liberación de ácidos orgánicos y de enzimas hidrolíticas (fosfatasa), incrementando de esta manera la disponibilidad de este elemento para los cultivos (Agarás et al. 2015; Alori et al. 2017; Kalayu 2019). Varios géneros bacterianos como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* solubilizan fosfatos y contribuyen a aumentar el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Kundu et al. 2009; Anzuay et al. 2013; Mohd Din et al. 2020). La diversidad y la riqueza de las bacterias solubilizadoras de P varía de un suelo a otro dependiendo de

sus propiedades fisicoquímicas y de factores climáticos (Kumar 2016).

Se observó que la inoculación con múltiples cepas de PGPR suele tener mejores resultados que la inoculación con una sola cepa bacteriana (Korir et al. 2017; Kaur et al. 2022). Combinando PGPR con diferentes capacidades metabólicas (e.g., fijación de N_2 , movilización de P, producción de fitohormonas y antimicrobianos, etc.) se pueden esperar efectos aditivos o sinérgicos como resultado de su combinación y, por tanto, una potenciación de la mejora del crecimiento del cultivo. En las regiones que están muy limitadas en el suministro de agua y, por lo tanto, en la cantidad de nutrientes disponibles que se disuelven en el agua del suelo, resulta muy interesante el potencial PGPR para promover el crecimiento de los cultivos por diferentes propiedades funcionales. Con esta premisa, en un ensayo de larga duración en la localidad de Bandera, provincia de Santiago del Estero, se estudió la comunidad de bacterias solubilizadoras de P comparando un suelo prístino y una situación agrícola con diversificación de rotaciones. A partir de la colección de BSP generada se seleccionaron aquellos aislamientos que presentaron mayor capacidad de solubilización y se evaluó su capacidad de promoción de crecimiento sobre plantas de maíz tanto en inoculaciones independientes como combinadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo y recolección de muestras

El estudio se llevó a cabo en un ensayo de larga duración en franjas establecido en el año 2002 sobre un suelo Haplustol típico perteneciente a la AER Bandera ubicada en el departamento Belgrano, al SE de la provincia de Santiago del Estero (25°48' S - 62°50' O, 223 m s. n. m.). La situación inicial del lote previa al establecimiento del ensayo incluye el desmonte y dos años de rotaciones bajo siembra directa (SD). El lote no se fertilizó y no se incorporaron los rastrojos (González et al. 2014). Las secuencias de cultivo incluyen algodón (*Gossypium hirsutum*), soja (*Glycine max*), trigo (*Triticum aestivum*) y sorgo (*Sorghum bicolor*) bajo SD, y se conforman de la siguiente manera: sorgo/soja/algodón (P1); soja/algodón/sorgo (P2); algodón/sorgo/soja (P3); trigo-soja/trigo-soja (P4); trigo-sorgo/trigo-soja/trigo-algodón (P5); sorgo/soja/soja (P6) y sorgo/algodón (P7). Se incluyó un

suelo prístino como situación de referencia (SP). Se establecieron tres estaciones de muestreo por franja. Las muestras de suelo fueron recolectadas a los 60 días posteriores a la fecha de siembra del cultivo de verano de la campaña 2013. Se tomaron muestras compuestas a los 0-10 cm de profundidad conformadas por 20 submuestras. Para los análisis químicos, una porción de suelo de cada muestra fue secada al aire y tamizada por 2 mm. La otra porción de suelo fue depositada en bolsas plásticas debidamente rotuladas y conservada a 4 °C hasta el momento de sus análisis microbiológicos.

Determinación de propiedades edáficas químicas y microbiológicas

Se determinó el contenido de carbono orgánico total (COT) (Walkley and Black 1934), nitrógeno total (NT) (Kjeldahl), pH (1: 2.5 suelo: agua) y P extractable (Bray and Kurtz 1945) de cada muestra. Para el recuento de bacterias heterotróficas cultivables (CBH) y de bacterias solubilizadoras de P (BSP) se empleó la metodología propuesta por Fernández et al. (2015). Las CBH se contaron 48 h después de la siembra en placa, mientras que las BSP se contaron después de 5 días de incubación a 28 °C. El número de bacterias fue expresado como UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de suelo seco. La abundancia relativa de BSP se calculó como la proporción de BSP respecto a CBH de acuerdo con Widdig et al. (2019). La actividad de la enzima fosfatasa ácida (AFA) se estimó aplicando la técnica detallada por Jackson et al. (2013). El contenido de humedad del suelo (%H) se determinó secando las muestras de suelo fresco a 105 °C durante 24 h hasta peso constante.

Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de P

Los aislamientos BSP con presencia de halo se purificaron en medio NBRIP (Nautiyal 1999) por estrías sucesivas y se reinocularon en el mismo medio durante una semana a 28±1 °C hasta la aparición de un halo claro alrededor de las colonias. El índice de solubilización se calculó restando el diámetro de la colonia del diámetro total y se aislaron las que mostraban halos mayores a los 0.5 cm para análisis posteriores (Hernández Guijarro et al. 2018). Los aislamientos altamente eficientes fueron sometidos al análisis rep-PCR y el mismo se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Versalovic et al. (1991). Las imágenes digitales

de los *fingerprints* se normalizaron con los marcadores de peso molecular utilizados como referencia y se analizaron con el programa BIONUMERICS®. La matriz de similitud fue calculada utilizando el coeficiente de similitud de Pearson, mientras que el dendrograma fue construido por el método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Para definir grupos se consideró una similitud del 60%. La identificación de las cepas fue realizada según Weisburg et al. (1991). Los productos amplificados se purificaron con el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (USA) y luego secuenciados en el Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación de ADN (SIGYSA), Instituto de Biotecnología (CNIA-INTA). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el banco de genes GeneBank (ncbi.nlm.nih.gov). La asignación de género fue realizada mediante las herramientas provistas en el sitio SILVA rRNA database (Pruesse et al. 2012).

Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfato

A los aislamientos que mostraron un mayor halo de solubilización de P en medio sólido NBRIP se les realizó un análisis cuantitativo de su capacidad de solubilización. Para ello se inocularon 40 mL de medio líquido NBRIP suplementado con fosfato tricálcico (1000 µg/mL) con 1 mL de cultivo (10⁸ UFC/mL) (200 rpm, 28 °C). Para la co-inoculación se transfirieron volúmenes iguales con un inóculo de 10⁸ UFC/mL de cada cultivo. Como control se empleó medio de cultivo sin inocular. Todos los cultivos se realizaron por triplicado. Cada 24 h y durante 5 días se tomó asepticamente una alícuota de 1 mL de cada cultivo y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos. Se determinó el P (PO₄³⁻) en los sobrenadantes de acuerdo al método del ácido ascórbico (Watanabe and Olsen 1965) y paralelamente se midió el pH y actividad fosfatasa ácida (Jackson et al. 2013).

Identificación de ácidos orgánicos. La detección y cuantificación de ácidos orgánicos se realizó a las 72 h de incubación. Para ello se tomaron alícuotas de cada cultivo que fueron filtradas a través de un filtro de celulosa de 0.22 µm de tamaño de poro y almacenadas a 4 °C. Para su posterior análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) se siguió el protocolo usado por Solans et al. (2019). La identificación de los ácidos orgánicos se llevó a cabo por comparación de

los tiempos de retención de sus estándares patrón con los de las muestras.

Ensayo de inoculación en cámara de crecimiento vegetal

El ensayo de inoculación se realizó según lo descrito en García et al. (2017). Los aislamientos seleccionados se incubaron a 28 ± 1 °C en agitación (180 rpm), durante 48 h, en medio líquido Luria Bertani (LB) (Sambrook et al. 1989). Las semillas de un híbrido de maíz comercial (DOW 510 PW), previamente desinfectadas con etanol 80% (v/v) e hipoclorito de sodio (4% cloro activo) germinaron en una cámara húmeda por 48 h a 28 °C. Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado con 10 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos analizados fueron inoculación simple con cada uno de los aislamientos seleccionados, tratamiento de co-inoculación y el control sin inocular. Se colocaron 2 semillas por maceta (750 cm^3 , 12 cm de altura) conteniendo una mezcla estéril de arena, tierra, vermiculita y perlita (3:3:3:1). El contenido de P de las macetas fue en promedio de 9 ppm. Las macetas se regaron a capacidad de campo un día antes de la siembra y se mantuvieron bajo riego a demanda durante todo el ensayo. A la semana todos los tratamientos se regaron con 5 mL por planta de solución nutritiva libre de P (Hoagland and Arnon 1950). Luego de 15 días, las plantas se cosecharon y se realizaron las siguientes mediciones: parámetros de crecimiento, longitud de parte aérea (LA) y raíces (LR); peso seco de la parte aérea de las plantas (PSA) y del sistema radicular (PSR); contenido de clorofila foliar empleando el

medidor portátil SPAD 502 (Minolta, Spectrum Technologies Inc., Illinois, USA); contenido de fósforo foliar según la metodología propuesta por Miller (1998). Para aquellos parámetros (PA) donde se detectó efecto significativo de la inoculación de los tratamientos, se calculó la respuesta a la inoculación (RI) de acuerdo a la siguiente relación (Hernández Guijarro et al. 2018):

$$RI(PA_i) = [(PA_i - \text{media } PA_i) / \text{media } PA_i] \times 100$$

Ecuación 1

donde PA_i corresponde al parámetro individual de las plantas inoculadas con cada una de las cepas, media PA_i (control) corresponde al valor promedio del parámetro individual de las plantas control (no inoculadas).

El análisis estadístico se realizó empleando el programa R versión 4.0.4. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y la comparación múltiple entre las medias se calcularon mediante la prueba LSD con un nivel de probabilidad del 5% ($P < 0.05$). Las correlaciones fueron calculadas utilizando el coeficiente de Pearson (R). El análisis de componentes principales (ACP) se realizó con el programa Infostat (Di Rienzo et al. 2017).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan las propiedades químicas y microbiológicas de suelos correspondientes a cada secuencia de cultivo y al suelo prístino. La concentración de COT (%) de las secuencias de cultivo evaluadas resultó menor respecto del suelo prístino,

Tabla 1. Valores promedios para propiedades químicas y microbiológicas de las parcelas con diferentes secuencias de cultivo y suelo prístino. SG=sorgo; SJ=soja; AG=algodón; TR=trigo; SP=suelo prístino; COT=carbono orgánico total; NT=nitrógeno total; P-Bray=fósforo Bray; CBH=bacterias heterotróficas cultivables; BSP=bacterias solubilizadoras de P; AFA=actividad fosfatasa ácida. UFC=unidades formadoras de colonias. Para cada variable, filas con letras diferentes indican diferencias significativas entre parcelas ($P < 0.05$).

Table 1. Average values of chemical and microbiological soil properties in plots with different crop sequences and pristine soil. SG=sorghum; SJ=soybean; AG=cotton; TR=wheat; SP=pristine soil; TOC=total organic carbon; NT=total nitrogen; P-Bray=phosphorus Bray; CBH:cultivable heterotrophic bacteria; PSB=P solubilizing bacteria; AFA=acid phosphatase activity. UFC=colony forming unit. Rows with different letters indicate significant differences between plots ($P < 0.05$).

| | COT (%) | NT (%) | pH 1:2.5 | P-Bray (ppm) | CBH (\log_{10} UFC/g suelo) | BSP (\log_{10} UFC/g suelo) | AFA ($\mu\text{mol pNP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) |
|----------------------|---------|--------|----------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| P1 SG/SJ/AG | 1.60 ab | 0.17 a | 6.9 a | 70.5 ab | 5.06 a | 2.58 ab | 4.10 bc |
| P2 SJ/AG/SG | 1.50 ab | 0.17 a | 7.0 a | 72.1 b | 4.91 a | 2.36 a | 2.68 ab |
| P3 AG/SG/SJ | 1.57 ab | 0.18 a | 7.1 a | 70.1 ab | 5.01a | 2.80 ab | 2.69 ab |
| P4 TR-SJ/TR-SJ | 1.40 a | 0.16 a | 7.0 a | 74.9 b | 4.92 a | 3.50 c | 1.73 a |
| P5 TR-SG/TR-SJ/TR-AG | 1.56 ab | 0.17 a | 6.9 a | 71.8 b | 5.12 a | 2.71 ab | 3.64 bc |
| P6 SG/SJ/SJ | 1.53 ab | 0.16 a | 7.0 a | 61.2 a | 5.22 ab | 3.17 bc | 4.58 c |
| P7 SG/AG | 1.63 bc | 0.18 a | 7.0 a | 75.9 b | 5.13 a | 3.19 bc | 2.94 abc |
| SP SUELO PRÍSTINO | 2.10c | 0.18 a | 7.0 a | 77.1 b | 5.50 b | 4.73 d | 6.58 d |

excepto para la secuencia sorgo/algodón (P7). La disponibilidad de P resultó ser menor en la secuencia sorgo/soja/soja (P6) respecto de las secuencias P2, P4, P5, P7 y el suelo prístino. No se observaron diferencias significativas para el contenido de N del suelo entre las secuencias agrícolas y el SP. Por otra parte, la abundancia de CBH fue mayor en la situación prístina con un valor promedio de 3.1×10^5 UFC/g mientras que la menor cantidad de CBH (1.0×10^5 UFC/g) se registró en la secuencia soja/algodón/sorgo (P2). Todas las secuencias de cultivo mostraron valores inferiores de abundancia de la población BSP respecto de la condición prístina (3.1×10^3 UFC/g) (Tabla 1). Entre secuencias de cultivo, la abundancia de BSP fue mayor en la secuencia trigo-soja/trigo-soja (P4) y mínima en soja/algodón/sorgo (P2) con valores promedio de 3.5 y 2.2×10^2 UFC/g, respectivamente. El porcentaje de BSP en el suelo prístino fue estadísticamente superior respecto al resto de las secuencias de cultivo estudiadas ($P < 0.0001$), oscilando entre un 17% (suelo prístino) y un 0.34% para la secuencia soja/algodón/sorgo (P2). Además, se observó un incremento significativo de dicho porcentaje en la secuencia trigo-soja/trigo-soja (P4) (4%) respecto al resto de las rotaciones. La actividad fosfatasa ácida presentó valores superiores en el suelo prístino respecto a los observados en las diferentes secuencias de cultivo (Tabla

1). La actividad fosfatasa mostró diferencias significativas entre secuencias de cultivo, con valores inferiores en P4 ($1.73 \mu\text{mol pNP} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) respecto de las secuencias P1, P5 y P6 (4.10 ; 3.64 y $4.58 \mu\text{mol pNP} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente). Por último, se analizó la existencia de alguna correlación entre los parámetros químicos y las variaciones en las poblaciones bacterianas totales, BSP y AFA. Dicho análisis reveló que el número total de bacterias cultivables y la población de BSP están correlacionados con el COT del suelo ($R = 0.6$; $P < 0.001$) ($R = 0.5$, $P < 0.01$), respectivamente. Sin embargo, no se comprobó ninguna correlación entre la abundancia de BSP y los contenidos de P en el suelo. Los valores de actividad fosfatasa mostraron una buena correlación y con el contenido del COT del suelo ($R = 0.43$, $P < 0.01$). El ACP mostró las propiedades químicas y microbiológicas que explican las relaciones entre las rotaciones evaluadas (Figura 1). El modelo explicó el 79.6% de la variación total. En el primer componente (CP1) se agrupan positivamente con altos valores el contenido de humedad (0.93), el contenido de Nt (0.94) y el COT (0.63) muy influenciados por el manejo realizado en las parcelas P2, P3 y P7. La dirección negativa de la CP1 fue explicada mayoritariamente por el recuento de BSP (-0.61) asociado con el manejo realizado en la parcela P4. Las variables que explican la

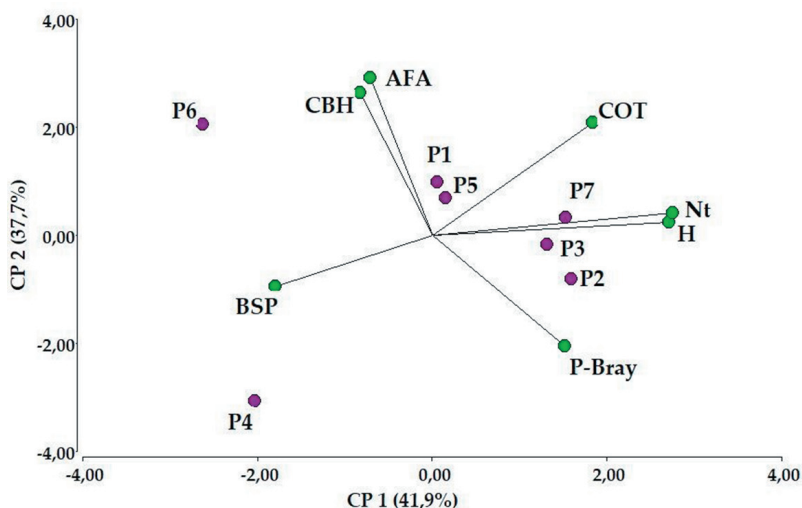


Figura 1. Análisis de componentes principales (ACP) construido en base a las propiedades químicas y microbiológicas para las parcelas con diferentes secuencias de cultivo. P1=sorgo/soja/algodón; P2=soja/algodón/sorgo; P3=algodón/sorgo/soja; P4=trigo-soja/trigo-soja; P5=trigo-sorgo/trigo-soja/trigo-algodón; P6=sorgo/soja/soja; P7=sorgo/algodón. COT=carbono orgánico total; Nt=nitrógeno total; P-Bray=fósforo Bray; H=humedad; CBH=bacterias heterotróficas cultivables; BSP=bacterias solubilizadoras de P; AFA=actividad fosfatasa ácida.

Figure 1. Principal Component Analysis (PCA) based on chemical and microbiological properties for plots with different crop sequence. P1=sorghum/soybean/cotton; P2=soybean/cotton/sorghum; P3=cotton/sorghum/soybean; P4=wheat-soybean/wheat-soybean; P5=wheat-sorghum/wheat-soybean/wheat-cotton; P6=sorghum/soybean/soybean; P7=sorghum/cotton. TOC=total organic carbon; Nt=total nitrogen; P-Bray=phosphorus Bray; H=moisture content; CBH=cultivable heterotrophic bacteria; PSB=P solubilizing bacteria; AFA=acid phosphatase activity.

dirección positiva de la segunda componente (CP2) estuvieron asociadas a la actividad de la enzima fosfatasa ácida (0.94), el recuento de CBH (0.85) y por la disponibilidad de COT (0.68) vinculados al manejo realizado en la P6.

Para la obtención de aislamientos con buen potencial de solubilización se utilizó como primer criterio de selección a aquellos que generaran un halo de solubilización en el medio NBRIP mayor a 0.5 cm. Se seleccionaron 22 aislamientos obtenidos a partir de las muestras de suelo de las secuencias P1, P3, P5 y P6, con índices de solubilización entre 1.2 y 2.2 cm. En el suelo prístino y en las parcelas P2, P4 y P7 no se encontraron aislamientos que cumplieran con el criterio de eficiencia. Los 22 aislamientos obtenidos fueron analizados en su diversidad genética. El propósito de este análisis es realizar una segunda selección de aislamientos que sean genéticamente diferentes para evitar utilizar en los estudios posteriores microorganismos que provengan de una misma célula parental. Para este propósito se utilizó el procedimiento rep-PCR. El análisis de los resultados obtenidos mostró una alta diversidad genética entre sus miembros lo cual descarta que provengan de

una misma célula parental. Los dendogramas generados tanto por BOX como con ERIC dividieron los aislamientos en 6 grupos (Figura 2). A partir de este análisis se seleccionaron 8 aislamientos no redundantes genéticamente. Estos aislamientos fueron identificados taxonómicamente mediante amplificación y secuenciación parcial del gen 16S ARN. Llamativamente todos los aislamientos provenientes de suelos de la parcela P3 corresponden a distintos miembros del género *Pseudomonas*, en tanto que los aislamientos provenientes de suelos de las parcelas P1, P5 y P6 resultaron más diversos conteniendo géneros tales como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. En particular el análisis comparativo de la secuencia 16S ARN del aislamiento SG5 con el proveniente de diferentes especies de *Pseudomonas* mostró un significativo agrupamiento con *Ps. koreensis* y distante de *Ps. aeruginosa*. Los resultados de ensayos microbiológicos clásicos (fluorescencia en medio King B, temperatura de crecimiento, etc.) concuerdan con la presunción de asignarle la especie *Ps. koreensis* a este aislamiento.

Es ampliamente conocido que el género *Pseudomonas* cuenta con especies tales como *Ps. aeruginosa*, potencialmente patógenas para

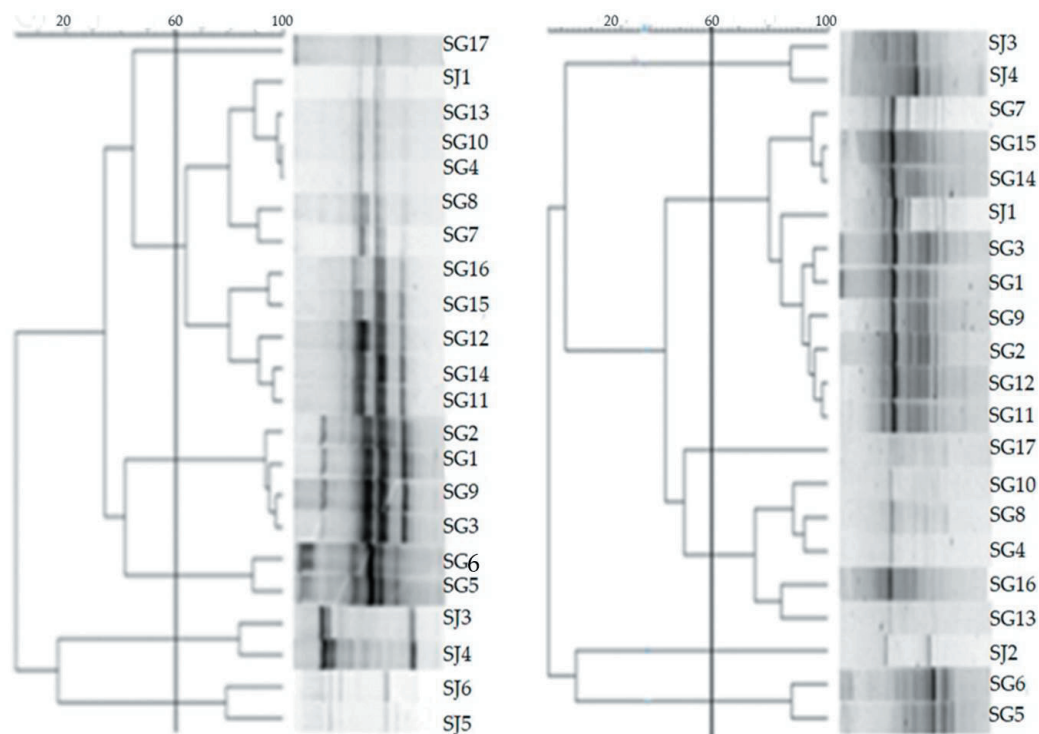


Figura 2. Dendrograma-UPGMA obtenido con: a) BOX y b) ERIC *fingerprints* de bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de las parcelas bajo estudio.

Figure 2. Cluster-UPGMA obtained with: a) BOX and b) ERIC *fingerprints* of phosphate solubilizing bacteria isolated from the plots under study.

el ser humano. Por lo tanto, dado que uno de los objetivos del presente trabajo es explorar aislamientos que puedan ser utilizados como bioinoculantes, los aislamientos que presentaron similitud con la especie *Ps. aeruginosa* fueron dejados de lado en los estudios subsiguientes. Se seleccionaron entonces los aislamientos *Ps. koreensis* (SG5) y *Paenibacillus pabuli* (SJ6).

En la Figura 3 se observa que la solubilización de fosfato tricálcico en el medio líquido de los ensayos evaluados fue acompañada por una caída significativa en el pH. La cepa *Ps. koreensis* (SG5) y la combinación *Ps. koreensis*

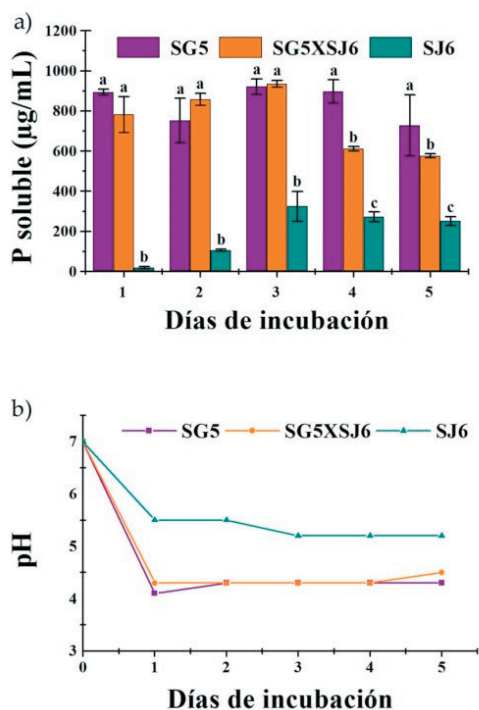


Figura 3. a) Solubilización de P durante 5 días de incubación para los ensayos con *Ps. koreensis* (SG5), *P. pabuli* (SJ6) y el ensayo combinado (SG5xSJ6) en medio suplementado con fosfato tricálcico. b) Evolución del pH durante 5 días de incubación para los ensayos inoculados con *Ps. koreensis* (SG5), *P. pabuli* (SJ6) y el ensayo combinado (SG5xSJ6) en medio suplementado con fosfato tricálcico. Las barras indican el desvío estándar. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada día de incubación ($P < 0.05$).

Figure 3. a) P solubilization during 5 days of incubation for *Ps. koreensis* (SG5), *P. pabuli* (SJ6) and the combined strains (SG5xSJ6) assays in medium supplemented with tricalcium phosphate. b) pH evolution during 5 days of incubation for the assays inoculated with *Ps. koreensis* (SG5), *P. pabuli* (SJ6) and the combined strains (SG5xSJ6) in a medium supplemented with tricalcium phosphate. Bars indicate standard deviation. Letters indicate significant differences between treatments for each day of incubation ($P < 0.05$).

x *P. pabuli* (SG5xSJ6) presentaron la mayor capacidad de acidificación del medio, un Δ pH de ~3 unidades, en tanto que la cepa *P. pabuli* (SJ6) mostró un Δ pH de ~1.5 unidades. La concentración de P soluble detectada en el medio líquido inoculado con *Ps. koreensis* (SJ5) y en el cultivo mixto de ambos microorganismos fue estadísticamente superior respecto al ensayo inoculado con *P. pabuli* (SJ6) (Figura 3), lo cual se correlaciona con la capacidad de acidificación del medio. El análisis de correlación mostró una relación negativa significativa entre el contenido de P soluble y el pH para el medio inoculado con *Ps. koreensis* ($R = -0.96$, $P < 0.000001$), en el tratamiento inoculado con *P. pabuli* ($R = -0.76$, $P < 0.0001$) y para el tratamiento combinado ($R = -0.93$, $P < 0.000001$). La mayor producción enzimática se registró a las 24 h de incubación tanto para el tratamiento con inoculación simple con *P. pabuli* como para el tratamiento combinado, siendo en este último tratamiento un 63% superior (Figura 4). No se registró correlación entre la concentración de P soluble y actividad enzimática. El análisis cromatográfico de los sobrenadantes del cultivo de *Ps. koreensis* permitió detectar una mezcla de los ácidos orgánicos, glucónico (0.065 mg/mL), cítrico (20.77 mg/mL) y acético (3.15 mg/mL), en tanto que en las condiciones ensayadas en el sobrenadante del cultivo de *P. pabuli* fue posible detectar la presencia de ácido oxálico (0.0216 mg/mL) y otros dos

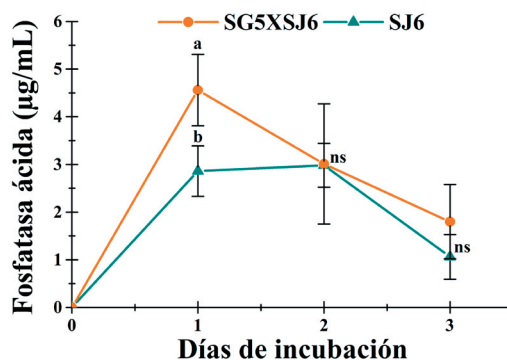


Figura 4. Actividad fosfatasa ácida durante 3 días de incubación para los ensayos con *P. pabuli* (SJ6) y el ensayo combinado *Ps. koreensis* x *P. pabuli* (SG5xSJ6) en medio suplementado con fosfato tricálcico. Las barras indican el desvío estándar. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada día de incubación ($P < 0.05$).

Figure 4. Acid phosphatase activity during 3 days of soil incubation for *P. pabuli* (SJ6) and *Ps. koreensis* x *P. pabuli* (SG5xSJ6) assays in a medium supplemented with tricalcium phosphate. Bars indicate standard deviation. Letters indicate significant differences between treatments for each day of incubation ($P < 0.05$).

Tabla 2. Identificación molecular en base al gen 16S rDNA de los aislamientos solubilizadores de P aislados de las parcelas bajo estudio.

Table 2. Molecular identification based on 16S rDNA gene from bacteria P solubilizing isolates in the plots under study.

| Identificación | Aislamiento | Número de acceso NCBI | Identidad % SILVA |
|-------------------------------|-------------|-----------------------|-------------------|
| <i>Bacillus simplex</i> | SJ2 | MH094286 | 99.03 |
| <i>Paenibacillus pabuli</i> | SJ6 | MH094279 | 99.57 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | SG8 | MH094281 | 99.92 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | SG9 | MH094284 | 99.91 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | SG14 | MH094284 | 99.91 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | SG17 | MH094285 | 99.21 |
| <i>Pseudomonas koreensis</i> | SG5 | MH094280 | 99.92 |
| <i>Xanthomonas campestris</i> | SJ3 | MH094283 | 99.58 |

ácidos no identificados. Llamativamente, en el cultivo mixto de ambos microorganismos la producción de ácido oxálico por parte de *P. pabuli* (SJ6) es suprimida y el sobrenadante muestra la misma composición que el sobrenadante de *Ps. koreensis* (SG5) con diferentes concentraciones de ácido glucónico (0.127 mg/mL), cítrico (3.29 mg/mL) y acético (0.238 mg/mL).

En el estudio en cámara de crecimiento vegetal se detectó variación en la respuesta de las plantas de maíz a la inoculación con las bacterias solubilizadoras de P seleccionadas (Tabla 3). Las inoculaciones con la cepa *P. pabuli* (SJ6) y *Ps. koreensis* (SG5) solo evidenciaron diferencias significativas de crecimiento de las plantas respecto al control en la longitud aérea (LA) y en proporciones aproximadamente equivalentes. Sin embargo, solo la cepa *Ps. koreensis* (SG5) proporcionó una respuesta en el contenido de P foliar generando un incremento del mismo del 54% en las plantas con respecto al control. El tratamiento combinado de ambos microorganismos produjo la mejor respuesta, incrementando significativamente todos los

parámetros evaluados con respecto al control y las inoculaciones simples.

DISCUSIÓN

Se sabe bien que los cambios en el uso y el manejo del suelo impactan directamente sobre la abundancia, la actividad y la composición de la comunidad microbiana del suelo, y, en consecuencia, sobre los procesos que la misma lleva a cabo (Ge et al. 2011; Tian et al. 2012). En este trabajo se pone en evidencia que el desmonte y posterior uso agrícola luego de 11 años redujo la abundancia de bacterias heterótrofas cultivables y, en mayor medida, la población de bacterias solubilizadoras de P. Esto se tradujo en una menor abundancia relativa de bacterias solubilizadoras de P en relación con el tamaño de la población de bacterias totales en los suelos agrícolas, en concordancia con lo observado antes por otros autores (Kaur and Kaur 2020). La diversificación de especies en las secuencias de cultivo por inclusión de sorgo y trigo como estrategia conservacionista no evidenció cambios notables en las propiedades químicas

Tabla 3. Respuesta del cultivo de maíz a la inoculación con *Pseudomonas koreensis* (SG5) y *Paenibacillus pabuli* (SJ6). Los valores entre paréntesis indican la respuesta a la inoculación en porcentaje respecto al control. Control (sin inocular); SG5 (*Ps. koreensis*); SJ6 (*P. pabuli*); SG5xSJ6 (*Ps. koreensis* x *P. pabuli*). LA=largo aéreo; LR=largo raíz; PSA=peso seco aéreo; PSR=peso seco raíz; Clorofila=SPAD chlorophyll; P=fósforo foliar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas por la inoculación (P<0.05).

Table 3. Maize response to inoculation with *Pseudomonas koreensis* (SG5) and *Paenibacillus pabuli* (SJ6).

Control (Uninoculated); SG5 (*Ps. koreensis*); SJ6 (*P. pabuli*); SG5xSJ6 (*Ps. koreensis* x *P. pabuli*). LA=aerial length; LR=radical length; PSA=aerial dry weight; PSR=root dry weight; Clorofila=SPAD chlorophyll; P=foliar P. Values in parentheses indicate inoculation response in percentage respect to the control. Different letters indicate statistical differences due to inoculation (P<0.05).

| Cepas | LA (cm) | LR (cm) | PSA (g/planta) | PSR (g/planta) | Clorofila (SPAD) | P (mg P/g MS) |
|---------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Control | 39.33±1.31b | 23.33±2.49b | 0.17±0.02b | 0.08±0.01b | 40.77±1.26b | 1.29±0.10b |
| SG5 | 42.83±0.62a (8.9) | 23.67±3.17b | 0.19±0.01ab | 0.07±0.01b | 40.80±1.27b | 2.02±0.20a (56.6) |
| SG5xSJ6 | 44.75±2.06a (13.8) | 30.00±4.08a (28.6) | 0.22±0.02a (29.4) | 0.11±0.01a (22.2) | 45.58±0.29a (11.8) | 2.12±0.21a (64.3) |
| SJ6 | 43.50±2.16a (9.8) | 23.35±1.70b | 0.19±0.02ab | 0.08±0.01 b | 41.97±1.18b | 1.46±0.18b |

y biológicas del suelo luego de 11 años de efectos acumulados. En este estudio se pudo comprobar una correlación positiva entre la abundancia de bacterias totales (CBH), la abundancia de bacterias BSP y la actividad fosfatasa en relación al COT del suelo. Estudios previos también evidenciaron relaciones directas entre estas variables (Chang et al. 2007; Dodor and Tabatabai 2003). Estos resultados estarían explicados por la capacidad de estas bacterias de mineralizar el P orgánico derivado de la materia orgánica, a través de la producción de enzimas fosfatasas (Gross et al. 2020; Liang et al. 2020). En este trabajo no se encontraron aislamientos eficientes, de acuerdo con nuestro criterio de selección, provenientes de la situación prístina; es decir que una mayor abundancia de BSP no se traduce en aislamientos con una fuerte capacidad solubilizadora, tal vez por no ser buenos competidores en ambientes con alta disponibilidad de nutrientes (Widdig et al. 2019; Nicolitch et al. 2016). La mayor cantidad de aislamientos en solubilizar P eficientemente se aislaron de la parcela con sorgo al momento de tomar las muestras (P3); sin embargo, el mayor tamaño de esta población no representa una mayor biodiversidad, ya que el género *Pseudomonas* fue el único identificado. Por el contrario, en las parcelas con soja sembrada, la comunidad de BSP fue más diversa, ya que se encontraron los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. Todos los aislamientos obtenidos pertenecen a géneros previamente descritos como solubilizadores de fósforo (Kundu et al. 2009; Vázquez et al. 2000).

La capacidad solubilizadora de los aislamientos *Ps. koreensis* y *P. pabuli* fue cuantificada por la determinación de P soluble en medio líquido simultáneamente con el cambio en el pH del medio y de la producción de ácidos orgánicos. Se observó una diferencia cuantitativa y cualitativa en la producción de ácidos orgánicos en los sobrenadantes inoculados con *Ps. koreensis* y *P. pabuli*. La relación inversa observada entre el pH y la concentración de P soluble sugiere que la producción de ácidos orgánicos por estas cepas juega un papel significativo en la acidificación del medio, facilitando la solubilización de P, tal como fuera reportado por otros autores (Walpola and Yoon 2013; Anzuay et al. 2017). En los sobrenadantes de cultivos inoculados con *P. pabuli* y en los inoculados con la combinación de aislamientos se detectó una baja secreción de la enzima fosfatasa ácida

(Figura 4). Es posible que esta baja actividad se deba a que su síntesis se estimula cuando es limitante el nivel de P inorgánico soluble (Dick et al. 2011) y a que esta enzima participa fundamentalmente en la mineralización de fosfatos orgánicos (Richardson et al. 2009). La ausencia de correlación entre la concentración de P soluble y la actividad de la fosfatasa ácida fue observada también por de Amaral Leite et al. (2019).

El uso de prácticas sustentables como la inoculación con bacterias nativas promotoras del crecimiento vegetal adaptadas a las condiciones en las que realizarán sus funciones constituye una estrategia que podría potenciar la eficacia del proceso (Pérez-Montaño et al. 2014). Numerosos estudios mostraron la capacidad de diversas BSP para incrementar el crecimiento y la captura de P sobre los cultivos (Fernández et al. 2007; Hariprasad and Niranjana 2009; Yu et al. 2011). En el ensayo de inoculación en cámara de cultivo vegetal se observó que la inoculación de maíz con *Ps. koreensis* (SG5) no aumentó los parámetros de crecimiento; sin embargo, elevó la eficiencia de la absorción de P posiblemente como resultado de la liberación de ácidos orgánicos de acuerdo a los resultados de los ensayos realizados *in vitro*. Por el contrario, la liberación de P durante la incubación *in vitro* con la cepa *P. pabuli* (SJ6) fue más lenta, y esto no se tradujo en una mayor absorción de P en la biomasa de maíz o incrementos en los parámetros de crecimiento, a pesar de haber solubilizado eficientemente P *in vitro*. En muchos casos, los consorcios microbianos pueden interactuar de manera sinérgica y estimular algunas actividades fisiológicas de las bacterias involucradas en la formulación (Bai et al. 2003; Stefan et al. 2013). En este sentido, el tratamiento combinado incrementó el peso y la longitud de las raíces, lo cual le permitió a la planta explorar un mayor volumen de suelo en busca de nutrientes y agua; esto, a su vez, le da mayor ventaja para absorber el P solubilizado producto, posiblemente, de la liberación de ácidos orgánicos y de una mayor actividad fosfatasa que fue detectado en los ensayos *in vitro*. La promoción del crecimiento de las plantas de maíz por la inoculación combinada se puede atribuir a una mayor incorporación de nutrientes en particular el P. Sin embargo, la solubilización de P no es el único mecanismo de promoción de crecimiento, tal como se puede observar en las plantas inoculadas con *Ps. koreensis* (SG5); podría ejercer su acción por un mecanismo diferente a la solubilización e

incorporación de P. Este hecho fue observado antes por diferentes autores (Collavino et al. 2010; Baig et al. 2012).

Los resultados aquí presentados aportan nuevas evidencias sobre el efecto de las rotaciones de cultivos sobre la comunidad bacteriana en suelos respecto a una situación prístina en un ensayo de larga duración. Si bien el análisis realizado en este estudio se restringe a bacterias cultivables, la disminución observada tanto de las bacterias totales como de las solubilizadoras sugiere que este comportamiento probablemente se extienda a la comunidad total. Para profundizar este análisis es evidente la necesidad de emplear procedimientos metagenómicos. Pese a que los aislamientos seleccionados en función del tamaño de halo no constituyen una muestra representativa de la población BSP original, la diversidad genética puesta de manifiesto por el análisis rep PCR estaría indicando que la población original tendría al menos este grado de diversidad o mayor. Los ensayos de inoculación combinada de aislamientos BSP aquí obtenidos sobre plantas de maíz ponen

de manifiesto un efecto sinérgico sobre la promoción de crecimiento de esta planta. Por lo tanto, el uso de inoculaciones mixtas en ecosistemas frágiles puede constituir una estrategia para aumentar la eficiencia de uso del P en maíz, complementando los mecanismos o procesos no solo de solubilización de P, sino también buscando incrementar la superficie explorada por las raíces que faciliten la adquisición de nutrientes y de agua.

Los resultados aquí presentados sugieren que si bien las poblaciones de BSP son más numerosas en suelos prístinos, determinadas rotaciones de cultivos a largo plazo favorecen el incremento de bacterias solubilizadoras más eficientes. Este aspecto debería tenerse en cuenta al diseñar futuras estrategias de búsqueda de potenciales bioinoculantes.

AGRADECIMIENTOS. El siguiente trabajo fue realizado con fondos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (No. PD I 037). Agradecemos a Amanda Vizgarra por la recolección de las muestras de suelos y a la EEA INTA Quimilí.

REFERENCIAS

- Agaras, B. C., M. Scandiani, A. Luque, L. Fernández, F. Farina, M. Carmona, M. Gally, A. Romero, L. Wall, and C. Valverde. 2015. Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. isolates. *Biological Control* 90:173-186. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.07.003>.
- Alori, E. T., B. R. Glick, and O. O. Babalola. 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology* 8:1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>.
- Anzuay, M. S., O. Frola, J. G. Angelini, L. M. Ludueña, A. Fabra, and T. Taurian. 2013. Genetic diversity of phosphate-solubilizing peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated bacteria and mechanisms involved in this ability. *Symbiosis* 60: 143-154. <https://doi.org/10.1007/s13199-013-0250-2>.
- Anzuay, M. S., M. G. R. Ciancio, L. M. Ludueña, J. G. Angelini, G. Barros, N. Pastor, and T. Taurian. 2017. Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. *Microbiological Research* 199:98-109. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.006>.
- Bai, Y., X. Zhou, and D. L. Smith. 2003. Enhanced Soybean Plant Growth Resulting from Coinoculation of *Bacillus* Strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Science* 43:1774-1781. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1774>.
- Baig, K. S., M. Arshad, B. Shaharoon, A. Khalid, and I. Ahmed. 2012. Comparative effectiveness of *Bacillus* spp. possessing either dual or single growth-promoting traits for improving phosphorus uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Microbiology* 62:1109-1119. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0352-0>.
- Baldassini, P., C. E. Bagnato, and J. M. Paruelo. 2020. How may deforestation rates and political instruments affect land use patterns and Carbon emissions in the semi-arid Chaco, Argentina? *Land Use Policy* 99:104985. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2020.104985>.
- Bray, R. H. and L. T. Kurtz. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59:39-45. <https://doi.org/10.1097/00010694-194501000-00006>.
- Chang, E. H., R. S. Chung, and Y. H. Tsai. 2007. Effect of different application rates of organic fertilizer on soil enzyme activity and microbial population. *Soil Science and Plant Nutrition* 53:132-140. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00122.x>.
- Collavino, M. M., P. A. Sansberro, L. A. Mroginski, and O. M. Aguilar. 2010. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils* 46:727-738. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0480-x>.
- de Amaral Leite, A., A. A. De Souza Cardoso, R. De Almeida Leite, S. M. De Oliveira-Longatti, J. F. L. Filho, F. M. De Souza Moreira, and L. C. A. Melo. 2020. Selected bacterial strains enhance phosphorus availability from biochar-based rock phosphate fertilizer. *Annals of Microbiology* 70:6. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01550-3>.
- Dick, C. F., A. L. A. Dos-Santos, and J. R. Meyer-Fernandes. 2011. Inorganic phosphate as an important regulator of

- phosphatases. *Enzyme Research* 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/103980>.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. González, M. Tablada, and C. W. Robledo. 2017. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dodor, D. E., and M. A. Tabatabai. 2003. Effect of cropping systems on phosphatases in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166:7-13. <https://doi.org/10.1002/jpln.200390016>.
- Fernández, L. A., P. Zalba, M. A. Gómez, and M. A. Sagardoy. 2007. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biology and Fertility of Soils* 43:805-809. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0172-3>.
- Fernández, L. A., B. Agaras, L. G. Wall, and C. Valverde. 2015. Abundance and ribotypes of phosphate-solubilizing bacteria in Argentinean agricultural soils under no-till management. *Annals of Microbiology* 65:1667-1678. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-1006-9>.
- Ferreras, L., G. Magra, P. Besson, E. Kovalevski, and F. García. 2007. Indicadores de calidad física en suelos de la Región Pampeana Norte de Argentina bajo siembra directa. *Ciencia del Suelo* 25(2):159-172.
- García, J. E., G. Maroniche, C. Creus, R. Suárez-Rodríguez, J. A. Ramírez-Trujillo, and M. D. Groppa. 2017. In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological Research* 202:21-29. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.007>.
- Ge, T., S. Nie, J. Wu, J. Shen, H. Xiao, C. Tong, D. Huang, Y. Hong, and K. Iwasaki. 2011. Chemical properties, microbial biomass, and activity differ between soils of organic and conventional horticultural systems under greenhouse and open field management: A case study. *Journal of Soils and Sediments* 11:25-36. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0293-4>.
- González, C. C., F. A. Galizzi, M. C. Sánchez, A. E. Azar, O. Puig, and G. Coronel. 2014. Efecto de secuencias de cultivos en siembra directa sobre propiedades de un Molisol. XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Bahía Blanca, Argentina.
- Gross, A., Y. Lin, P. K. Weber, J. Pett-Ridge, and W. L. Silver. 2020. The role of soil redox conditions in microbial phosphorus cycling in humid tropical forests. *Ecology* 101:1-10. <https://doi.org/10.1002/ecy.2928>.
- Grover, M., S. Bodhankar, A. Sharma, P. Sharma, J. Singh, and L. Nain. 2021. PGPR Mediated Alterations in Root Traits: Way Toward Sustainable Crop Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4:618230. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.618230>.
- Hariprasad, P., and S. R. Niranjana. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and Soil* 316:13-24. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9754-6>.
- Hernández Guijarro, K., F. Covacevich, V. C. Aparicio, and E. De Geronimo. 2018. Bacterias Nativas del suelo con potencial para la degradación de Glifosato y promoción del Crecimiento Vegetal. *Asociación Argentina Ciencia de Suelo* 36:24-137.
- Hoagland, D. R., and D. I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Second edition. California Agricultural Experiment Station Circular 347:1-40.
- Jackson, C. R., H. L. Tyler, and J. J. Millar. 2013. Determination of microbial extracellular enzyme activity in waters, soils, and sediments using high throughput microplate assays. *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/50399-v>.
- Kalayu, G. 2019. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy* 2019:1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>.
- Kaur, T., R. Devi, S. Kumar, I. Sheikh, D. Kour, and A. N. Yadav. 2022. Microbial consortium with nitrogen fixing and mineral solubilizing attributes for growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Heliyon* 8(4):e09326. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09326>.
- Kaur, R., and S. Kaur. 2020. Variation in the Phosphate Solubilizing Bacteria from Virgin and the Agricultural Soils of Punjab. *Current Microbiology* 77:2118-2127. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02080-6>.
- Korir, H., N. W. Mungai, M. Thuita, Y. Hamba, and C. Masso. 2017. Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. *Frontiers in Plant Science* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00141>.
- Kumar, A. 2016. Phosphate solubilizing bacteria in agriculture biotechnology: diversity, mechanism and their role in plant growth and crop yield. *International Journal of Advanced Research* 4:116-124. <http://doi.org/10.21474/IJAR01/111>.
- Kundu, B. S., K. Nehra, R. Yadav, and M. Tomar. 2009. Biodiversity of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere of chickpea, mustard and wheat grown in different regions of Haryana. *Indian Journal of Microbiology* 49(2):120-127. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0016-y>.
- Liang, J. L., J. Liu, P. Jia, T. Tao Yang, Q. Wei Zeng, S. Chang Zhang, B. Liao, W. Sheng Shu, and J. Tian Li. 2020. Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. *ISME Journal* 14:1600-1613. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0632-4>.
- Miller, R. O. 1998. Nitric-perchloric acid wet digestion in an open vessel. Pp. 57-62 *en* Y. P. Kalra (ed.). *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*, CRC Press, Washington DC, USA. <https://doi.org/10.1201/9781420049398.ch6>.
- Mohd Din, A. R. J., M. A. Rosli, Z. Mohamad Azam, N. Z. Othman, and M. R. Sarmidi. 2020. *Paenibacillus polymyxa* Role Involved in Phosphate Solubilization and Growth Promotion of *Zea mays* Under Abiotic Stress Condition. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences* 90:63-71. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01081-1>.

- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170:265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>.
- Nicolitch, O., M. Feucherolles, J. L. Churin, L. Fauchery, M. P. Turpault, and S. Uroz. 2016. A microcosm approach highlights the response of soil mineral weathering bacterial communities to an increase of K and Mg availability. *Sci Rep* 9:14403 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50730-y>.
- Pérez-Montaña, F., C. Alías-Villegas, R. A. Bellogín, P. Del Cerro, M. R. Espuny, I. Jiménez-Guerrero, F. J. López-Baena, F. J. Ollero, and T. Cubo. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research* 169:325-336. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2013.09.011>.
- Pruesse, E., J. Peplies, and F. O. Glöckner. 2012. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28:1823-1829. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts252>.
- Revelli, R. G., R. C. Gagliardi, O. A. Sbodio, and E. J. Tercero. 2010. Propiedades fisicoquímicas en suelos predominantes del noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, Argentina. *Ciencia del Suelo* 28:123-130.
- Richardson, A. E., J. M. Barea, A. M. McNeill, and C. Prigent-Combaret. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321:305-339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Solans, M., M. I. Messuti, G. Reiner, M. Boenel, G. Vobis, L. G. Wall, and J. M. Scervino 2019. Exploring the response of Actinobacteria to the presence of phosphorus salts sources: Metabolic and co-metabolic processes. *Journal of Basic Microbiology* 59:487-495. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800508>.
- Stefan, M., N. Munteanu, V. Stoleru, M. Mihasan, and L. Hritcu. 2013. Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Scientia Horticulturae* 151: 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.12.006>.
- Tian, J., M. Fan, J. Guo, P. Marschner, X. Li, and Y. Kuzyakov. 2012. Effects of land use intensity on dissolved organic carbon properties and microbial community structure. *European Journal of Soil Biology* 52:67-72. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.07.002>.
- Vázquez, P., G. Holguín, M. E. Puente, A. Lopez-Cortes, and Y. Bashan. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils* 30:460-468. <https://doi.org/10.1007/s003740050024>.
- Versalovic, J., T. Koeuth, and R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19:6823-6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>.
- Walkley, A. and I. A. Black. 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37:29-38. <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>.
- Walpolá, B. C., and M. Yoon. 2013. In vitro solubilization of inorganic phosphates by phosphate solubilizing microorganisms. *African Journal of Microbiology Research* 7:3534-3541.
- Watanabe, F. S., and S. R. Olsen. 1965. Test of an Ascorbic Acid Method for Determining Phosphorus in Water and NaHCO₃ Extracts from Soil. *Soil Science Society of America Journal* 29:677-678. <https://doi.org/10.2136/sssaj1965.03615995002900060025x>.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173:697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
- Widdig, M., P. M. Schleuss, A. R. Weig, A. Guhr, L. A. Biederman, E. T. Borer, M. J. Crawley, K. P. Kirkman, E. W. Seabloom, P. D. Wragg, and M. Spohn. 2019. Nitrogen and Phosphorus Additions Alter the Abundance of Phosphorus-Solubilizing Bacteria and Phosphatase Activity in Grassland Soils. *Frontiers in Environmental Science* 7:1-15. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00185>.
- Yu, X., X. Liu, T. H. Zhu, G. H. Liu, and C. Mao. 2011. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biology and Fertility of Soils* 47:437-446. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0548-2>.