

COMPOSICIÓN BIOINOCULANTE QUE COMPRENDE UN CONSORCIO BACTERIANO EN UN
MEDIO A BASE DE SOLANUM TUBEROSUM Y UN MÉTODO PARA PRODUCIRLA

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se relaciona con composiciones bioinoculantes de tipo bioestimulante y biofertilizante empleadas en la producción agrícola. Particularmente, la invención divulga una composición en un medio biodegradable a base de *Solanum tuberosum* que comprende microorganismos promotores del crecimiento vegetal, así como el método para producir la misma.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El desarrollo de la agricultura ha llevado al uso intensivo de fertilizantes químicos como fuentes de fósforo, nitrógeno y otros nutrientes, aumentando así la polución en el agua y afectando tanto la estructura y compactación del suelo como las interacciones ecológicas de la microbiota asociada al suelo. Por consiguiente, uno de los principales enfoques de la investigación en la industria agrícola es la búsqueda de estrategias eficientes para mejorar la productividad de suelos y cultivos implementando soluciones costo-eficientes y ecológicamente viables.

15

20

Se ha encontrado que algunas interacciones entre plantas y microorganismos tienen efectos benéficos para el crecimiento de la planta, por tanto, el uso de microorganismos en composiciones de aplicación agrícola ha sido ampliamente estudiado como una alternativa a la utilización de productos de síntesis química. Particularmente, microorganismos como: *Azotobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Acetobacter* spp., *Azospirillum* spp., *Rhizobium* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Klebsiella* spp. y *Bacillus* spp., son comúnmente conocidos como promotores del crecimiento vegetal y se pueden agrupar bajo distintos grupos funcionales según su aporte de nutrientes al suelo o al crecimiento de la planta, por ejemplo, la fijación de nitrógeno, la solubilización y movilización de nutrientes, la síntesis de reguladores de crecimiento vegetal y la producción de sideróforos.

25

30

Comúnmente, el desarrollo de biofertilizantes se ha centrado en emplear consorcios que suplementen la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno o fósforo por separado, mas no se han enfocado en integrar de manera eficaz diferentes grupos funcionales bacterianos benéficos que promuevan el crecimiento de plantas. Es decir que, si bien existen biofertilizantes que incluyen microorganismos productores de derivados indólicos, solubilizadores de fósforo o fijadores de nitrógeno por separado, son limitados en la técnica los ejemplos de biofertilizantes que se enfocan en proveer consorcios viables que combinen efectivamente diferentes grupos funcionales de microorganismos promotores del crecimiento vegetal. De esta manera, los biofertilizantes existentes tienen un efecto limitado en la disminución del uso de la fertilización con productos de síntesis química, dado que se centran en aportar un único nutriente o un tipo de moléculas que estimulen el crecimiento vegetal, mas no constituyen un complemento o una alternativa que suplemente de manera integral las necesidades nutricionales de las plantas.

A pesar de que muchos autores han evaluado el uso de microorganismos benéficos para el crecimiento de plantas, el desarrollo de biofertilizantes enfrenta diversos problemas técnicos respecto del costo de producción y calidad del producto. Así mismo, las formulaciones de biofertilizantes requieren ingredientes y vehículos adicionales que prolonguen la vida útil del producto y al mismo tiempo garanticen la estabilidad de la actividad microbiana, los cuales comúnmente provienen de fuentes no biodegradables. Adicionalmente, el uso de consorcios microbianos conlleva en sí mismo retos técnicos tales como mitigar la rápida disminución de las poblaciones bacterianas una vez estas son aplicadas al suelo a fin de mantener un recuento de células viables que sea efectivo para promover el crecimiento vegetal durante periodos prolongados de tiempo.

Con base en lo anterior, se identifica en la técnica la necesidad de desarrollar un biofertilizante que permita reducir o reemplazar el uso de productos y componentes de síntesis química adicionales, con un coste de producción reducido y a base de ingredientes biodegradables. De igual manera, se evidencia la necesidad de un biofertilizante que agrupe diferentes grupos funcionales de bacterias con interacciones benéficas para el crecimiento vegetal, tales como la fijación de nitrógeno, la solubilización de nutrientes, la síntesis de reguladores de crecimiento vegetal, y la producción de sideróforos; en donde el medio usado en el fertilizante permita mantener un recuento celular significativo del

consorcio empleado, que garantice la actividad promotora del crecimiento vegetal y asegure una tiempo de vida útil prolongado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

La presente invención se relaciona con una composición bioinoculante de tipo bioestimulante y biofertilizante para aplicación agrícola a base de *Solanum tuberosum*, la cual sirve de medio para un consorcio bacteriano que incluye al menos una cepa solubilizadora de fósforo, al menos una cepa productora de sideróforos, al menos una
10 cepa productora de derivados indólicos y al menos una cepa fijadora de nitrógeno; en donde la composición incluye al menos una fuente de carbono y uno o más derivados indólicos.

15

La invención se refiere además a un método para producir la composición bioinoculante aquí revelada, el cual comprende las etapas de: preparar un medio a base de *Solanum tuberosum*, que comprende *Solanum tuberosum*, al menos una fuente de carbono y uno o más precursores de derivados indólicos; inocular el medio con al menos un consorcio bacteriano que comprende al menos una cepa solubilizadora de fósforo, al menos una cepa productora de sideróforos, al menos una cepa productora de derivados indólicos y al
20 menos una cepa fijadora de nitrógeno; e incubar el medio a base de *Solanum tuberosum* hasta obtener una concentración óptima de uno o más derivados indólicos.

25

De manera ventajosa, el producto y el método de la presente invención proveen una alternativa o complemento a la fertilización química de cultivos, promoviendo el crecimiento vegetal al mismo tiempo que mantiene recuentos estables de células microbianas después de su aplicación en el sustrato o en el material vegetal, así como un tiempo de vida útil prolongado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30

Figura 1. La Figura 1 muestra el ensayo de producción de derivados indólicos para las cepas *Stenotrophomonas* sp. y *Enterobacter* sp. en diferentes condiciones de cultivo y concentraciones de triptófano, en donde el eje vertical corresponde a la concentración de ácido indol acético (AIA).

Figura 2. La Figura 2 muestra el ensayo de producción de derivados indólicos en diferentes medios de cultivo para las cepas *Stenotrophomonas* sp., *Enterobacter* sp. y el consorcio seleccionado, en donde el eje vertical corresponde a la concentración de ácido indol acético (AIA).

Figura 3. La Figura 3 indica la longitud radical (LR) de plantas de maíz 60 días después de ser tratadas con fertilizantes químicos, cepas puras del consorcio por separado, o, diferentes lotes de la composición, bajo condiciones de invernadero.

Figura 4. La Figura 4 muestra el peso fresco aéreo (PFA) de plantas de maíz 60 días después de ser tratadas con fertilizantes químicos, cepas puras del consorcio por separado, o, diferentes lotes de la composición, bajo condiciones de invernadero.

Figura 5. La Figura 5 expone el peso fresco de las raíces (PFR) en plantas de maíz 60 días después de ser tratadas con fertilizantes químicos, cepas puras del consorcio por separado, o, diferentes lotes de la composición, bajo condiciones de invernadero.

Figura 6. La Figura 6 expone indicadores de crecimiento de plantas *Pinus caribaea* 60 días después de ser tratadas con diferentes tratamientos de fertilización química y biológica.

Figura 7. La Figura 7 evidencia indicadores de crecimiento de plantas *Pinus caribaea* 90 días después de ser tratadas con diferentes tratamientos de fertilización química y biológica.

Figura 8. La Figura 8 expone Indicadores de crecimiento de plantas *Pinus caribaea* 120 días después de la siembra con diferentes tratamientos de fertilización química y biológica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con una composición bioinoculante de tipo bioestimulante y biofertilizante para aplicación agrícola que comprende un medio a base de *Solanum tuberosum*, al menos una fuente de carbono y al menos un consorcio de

cepas bacterianas el cual comprende al menos una cepa solubilizadora de fósforo, al menos una cepa productora de sideróforos, al menos una cepa productora de derivados indólicos y al menos una cepa fijadora de nitrógeno.

- 5 La composición de la presente invención se caracteriza por emplear un medio de bajo costo a base de *Solanum tuberosum* con una concentración de *Solanum tuberosum* de entre el 10% y el 40% p/v de la composición, preferiblemente 20% p/v de la composición.

- Adicionalmente, la composición de acuerdo con la presente invención incluye una fuente de carbono. De manera preferida, la fuente de carbono se encuentra en un rango entre 0,01 % a 5 % p/v de la composición, de manera aún más preferida entre 0,1 % y 1 % p/v de la composición. De acuerdo con otra realización preferida, la fuente de carbono comprende compuestos orgánicos, tales como azúcares. Según otra modalidad de la invención, la fuente de carbono se selecciona del grupo que comprende: ácido málico, manitol, fructosa, glicerol, sacarosa o combinaciones de las mismas. Una realización aún más preferida, revela que la fuente de carbono es sacarosa.

- La composición aquí descrita comprende además al menos un consorcio bacteriano que incluye al menos una cepa solubilizadora de fósforo, al menos una cepa productora de sideróforos, al menos una cepa productora de derivados indólicos y al menos una cepa fijadora de nitrógeno. Es una característica de la presente invención que el conteo bacteriano del consorcio es mayor a 1×10^4 UFC/ml, preferiblemente mayor a 1×10^8 UFC/ml.

- 25 En una modalidad de la invención, la cepa solubilizadora de fósforo corresponde a microorganismos del género *Enterobacter*.

- De acuerdo con una modalidad de la invención, la cepa productora de sideróforos corresponde a microorganismos del género *Enterobacter*.

- 30 Según otra realización de la invención la cepa productora de derivados indólicos corresponde a microorganismos del género *Stenotrophomonas*.

De acuerdo con una modalidad de la invención, la cepa productora de derivados indólicos corresponde a microorganismos del género *Serratia*.

Según una realización de la invención, la composición bioinoculante comprende un consorcio en donde la al menos una cepa solubilizadora de fósforo corresponde a microorganismos del género *Enterobacter*, la al menos una cepa productora de sideróforos corresponde a microorganismos del género *Enterobacter*, la al menos una cepa productora de derivados indólicos corresponde a microorganismos del género *Stenotrophomonas*. y la al menos una cepa fijadora de nitrógeno corresponde a microorganismos del género *Serratia*.

Se ha identificado que las cepas bacterianas empleadas dentro de la composición de la presente invención son cepas inocuas, no amilolíticas. Por consiguiente, la fuente de carbono empleada por dichas cepas para su crecimiento no corresponde al almidón que puedan aportar la *Solanum tuberosum*, sino a otras fuentes adicionales de carbono. De acuerdo con lo anterior, resulta claro que la inclusión de un medio a base de *Solanum tuberosum*, no tiene como objetivo esencial proveer una fuente de carbono para las cepas del consorcio.

De manera sorprendente se evidenció que el uso del medio *Solanum tuberosum* hace posible la obtención de rangos de derivados indólicos adecuados bajo condiciones costo eficientes de producción y, así mismo, favorece la producción de los mismos en condiciones de cocultivo que emplean el consorcio de acuerdo con la presente invención. Lo anterior hace posible la obtención de rangos adecuados de derivados indólicos que no sobrepasen una concentración de 0,1% p/v de la composición, preferiblemente 0,0008% y 0,005% p/v de la composición, lo cual es un efecto favorable teniendo en cuenta que altas concentraciones de derivados indólicos generan efectos deletéreos en las plantas.

De manera ventajosa, la composición aquí revelada genera un crecimiento superior en las variables evaluadas respecto de otros tratamientos tales como la fertilización química o la inoculación por separado con las cepas que componen el consorcio de acuerdo con la presente invención.

Adicionalmente, la presente invención se puede emplear en conjunto con un esquema de fertilización química, alcanzando índices de crecimiento mayores que los evidenciados al emplear únicamente productos de síntesis química; demostrando que el consorcio revelado permite reducir el uso de fertilizantes químicos, al mismo tiempo que mejora el efecto promotor del crecimiento vegetal de los mismos. El consorcio de bacterias relacionado con la presente invención es compatible de manera no limitativa con fertilizantes como NPK, DAP, Sulpomag, Fertigro, Humita, Nutriponic entre otros.

La composición aquí descrita no requiere refrigeración y es estable durante al menos 120 días a temperaturas de 16°C a 24°C.

Otra realización la presente invención se relaciona con un método para fertilizar plantas que comprende diluir la composición en agua y aplicarla al sustrato o al material vegetal.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se revela un método para producir la composición bioinoculante aquí descrita, el cual comprende las etapas de preparar un medio a base de *Solanum tuberosum*, inocular dicho medio con al menos un consorcio de cepas bacterianas e incubar el mismo.

El medio a base de *Solanum tuberosum* comprende: *Solanum tuberosum*, uno o más precursores de derivados indólicos y al menos una fuente de carbono.

Según la presente invención, la preparación del medio a base de *Solanum tuberosum* se lleva a cabo introduciendo *Solanum tuberosum* en agua y sometiéndola a temperatura de ebullición hasta que ésta reduzca su firmeza. Los residuos sólidos restantes se retiran filtrando el caldo resultante. Posteriormente, se agregan al medio al menos una fuente de carbono y los uno o más precursores de derivados indólicos en la concentración deseada.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el medio a base de *Solanum tuberosum* se prepara de tal manera que la concentración de *Solanum tuberosum* en el medio se encuentre entre el 10% y el 40% p/v de la composición, preferiblemente 20% p/v de la composición.

La presente invención se caracteriza además en que el medio a base de *Solanum tuberosum* se prepara de tal manera que la concentración de la fuente de carbono se encuentre entre el 0,01% y el 5% p/v de la composición. De manera aún más preferida, la concentración de carbono se encuentra entre el 0,1% y el 1% p/v de la composición. De acuerdo con otra realización preferida, la fuente de carbono comprende compuestos orgánicos, tales como azúcares. Según otra modalidad de la invención, la fuente de carbono se selecciona del grupo que comprende: ácido málico, manitol, fructosa, glicerol, sacarosa o combinaciones de las mismas. Según una modalidad de la invención, la fuente de carbono es sacarosa.

10

De manera preferente, el medio a base de *Solanum tuberosum* según el método de la presente invención se prepara de tal manera que la concentración de los uno o más precursores de derivados indólicos se encuentre entre el 0,05% y el 1% p/v de la composición. De manera preferente, el precursor de derivados indólicos es triptófano.

15

Luego de preparar el medio a base de *Solanum tuberosum*, se procede a inocular el medio con un consorcio bacteriano. De acuerdo con la presente invención, el consorcio bacteriano comprende al menos una cepa solubilizadora de fósforo, al menos una cepa productora de sideróforos, al menos una cepa productora de derivados indólicos y al menos una cepa fijadora de nitrógeno.

20

En una modalidad de la invención la cepa solubilizadora de fósforo corresponde a microorganismos del género *Enterobacter*.

25 Según otra realización de la invención, la cepa productora de sideróforos corresponde a microorganismos del género *Enterobacter*.

En una modalidad de la invención la cepa productora de derivados indólicos corresponde a microorganismos del género *Stenotrophomonas*.

30

De acuerdo con una modalidad de la invención, la cepa fijadora de nitrógeno corresponde a microorganismos del género *Serratia*.

Según una realización de la invención, la composición bioinoculante comprende un consorcio en donde la al menos una cepa solubilizadora de fósforo corresponde a microorganismos del género *Enterobacter*, la al menos una cepa productora de sideróforos corresponde a microorganismos del género *Enterobacter*, la al menos una
5 cepa productora de derivados indólicos corresponde a microorganismos del género *Stenotrophomonas* y la al menos una cepa fijadora de nitrógeno corresponde a microorganismos del género *Serratia*.

Posteriormente, el medio inoculado es incubado hasta obtener una concentración
10 máxima de 0.1% p/v de uno o más derivados indólicos y un conteo bacteriano superior a 10^4 UFC/ml, preferentemente mayor a 10^8 UFC/ml. Según una realización, el medio es incubado hasta obtener una concentración de derivados indólicos entre 0,0008% a 0,005% p/v de la composición. Una modalidad preferida del método revela que la etapa de incubación se lleva a cabo durante al menos 6 horas, de manera preferida 7 a 17 horas y
15 de manera aún más preferida de 9 a 15 horas. Adicionalmente, el paso de incubación del método aquí revelado se realiza a una temperatura de 20°C a 40°C, preferiblemente a $30^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$.

La presente invención será ejemplificada de manera no limitativa por las realizaciones
20 particulares a continuación.

EJEMPLOS

1. Pruebas de inocuidad de las cepas seleccionadas sobre modelo biológico 25 *Caenorhabditis elegans*.

Se realizaron pruebas de inocuidad de las cepas seleccionadas sobre el modelo biológico *Caenorhabditis elegans*, evidenciando que éstas no presentan un efecto patogénico sobre el nemátodo, encontrando porcentajes de mortalidad similares al obtenido en el control
30 negativo, como se aprecia en la Tabla 1.

Tabla 1. Pruebas de inocuidad de las cepas seleccionadas sobre *Caenorhabditis elegans*, en donde se muestra que los porcentajes de mortalidad del modelo biológico en presencia de las cepas seleccionadas son similares a los valores evidenciados en el tratamiento control.

Cepa bacteriana	Porcentaje de mortalidad de nematodos después de 96h de evaluación
<i>E. coli</i> OP50 (control negativo)	13%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (control positivo)	90%
Solubilizadora de fósforo perteneciente al género <i>Enterobacter</i>	19,8%
Productora de sideróforos perteneciente al género <i>Enterobacter</i>	16,5%
Fijadora de nitrógeno perteneciente al género <i>Serratia</i>	23%

5

2. Evaluación cualitativa de la actividad amilolítica de las cepas y del consorcio

Las cepas seleccionadas fueron sembradas en agar papa (sólido) con y sin fuentes adicionales de carbono, evidenciando que ninguna de ellas tiene actividad amilolítica. El indicador cualitativo de la presencia de actividad amilolítica fue la formación de un halo de hidrólisis del almidón alrededor de las colonias. Ninguna de las cepas seleccionadas presentó dicho halo de hidrólisis.

Tabla 2. Evaluación cualitativa de la actividad amilolítica de las cepas y del consorcio sembradas en agar papa sin fuentes adicionales de carbono.

Cepa /Producto	Crecimiento	Actividad amilolíticas
Cepa productora de sideróforos perteneciente al género <i>Enterobacter</i>	Presenta crecimiento	No se observan halos de hidrólisis
Cepa solubilizadora de fósforo perteneciente al género <i>Enterobacter</i>	Presenta crecimiento	No se observan halos de hidrólisis
Cepa productora de sideróforos perteneciente al género <i>Serratia</i>	Presenta crecimiento	No se observan halos de hidrólisis
Cepa productora de derivados indólicos perteneciente al género	Presenta crecimiento	No se observan halos de hidrólisis

Cepa /Producto	Crecimiento	Actividad amilolíticas
<i>Stenotrophomonas</i>		
Consorcio	Presenta crecimiento	No se observan halos de hidrólisis

Lo anterior evidencia que las cepas seleccionadas no poseen actividad amilolítica, es decir que no emplean el almidón como fuente de carbono.

3. Evaluación de medio *Solanum tuberosum*-sacarosa-triptófano y el medio suplementado con soya y levadura sobre la producción de derivados indólicos en los microorganismos de los géneros *Stenotrophomonas* y *Enterobacter* productoras de ácido indol acético.

Los microorganismos seleccionados se cultivaron de manera independiente según su cinética de crecimiento (9 horas a 30°C y 120 rpm para los microorganismos del género *Enterobacter* y 15 horas a 30°C y 120 rpm para los microorganismos del género *Stenotrophomonas*) y en cocultivo de 9 horas y de 15 horas. Los medios de cultivo evaluados fueron:

- M1: Caldo Nutritivo
 - M2: Caldo *Solanum tuberosum* 20% p/v + sacarosa 0.25% p/v de la composición
 - M3: Caldo *Solanum tuberosum* + soya + levadura
- a los cuales se adicionaron tres concentraciones diferentes de un precursor indólico, triptófano, para evaluar la producción de derivados indólicos.

La Figura 1 evidencia que la producción de derivados indólicos es mayor para los microorganismos del género *Stenotrophomonas* en caldo nutritivo y para el cocultivo bacteriano tanto en M2 como en M3 después de 15 horas de incubación. Considerando que el método para producir una composición debe ser llevado a cabo bajo las condiciones más costo-eficientes, se seleccionó como medio el caldo *Solanum tuberosum* 20% p/v + sacarosa 0,25% p/v + Trp 0,2% de la composición, teniendo en cuenta que el tiempo de producción de cultivo de 9 horas permite alcanzar un conteo bacteriano mayor a 10⁸ UFC/ml y que dicho medio permite la producción de un rango de concentración adecuado de derivados de indol con una concentración relativamente baja de triptófano como un precursor de derivados de indol.

Asimismo, en la Figura 1 se observa que a las nueve horas el cocultivo en el medio caldo *Solanum tuberosum* 20% p/v + sacarosa 0.25% p/v + 0,2 % p/v triptófano presenta una concentración inicial ideal de derivados indólicos que no sobrepasa las 10 ppm, lo cual no ocurre empleando la misma concentración de triptófano en los medios M1 y M2.

Adicionalmente, la concentración de derivados indólicos después de las 9 horas de incubación, está presente en el medio en un rango tal que dicha concentración no sobrepase el 0,1% p/v de la composición al final de tiempo de vida útil de la misma, lo cual es relevante para la formulación y aplicación de la composición, debido a que se ha evidenciado que una concentración elevada de derivados indólicos conlleva efectos deletéreos para las plantas. Esto indica que únicamente el medio revelado por la presente invención promueve la producción de derivados indólicos en el menor tiempo de cocultivo evaluado y empleando concentraciones bajas de triptófano el cual es un reactivo de alto costo.

4. Selección del medio de cultivo para el consorcio con base en la producción de derivados indólicos: Evaluación de caldo *Solanum tuberosum*-sacarosa-triptófano vs. caldo nutritivo

Se evaluó la producción de derivados indólicos de los microorganismos de los géneros *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* por separado y del consorcio seleccionado en dos medios diferentes: caldo nutritivo comercial (marca Difco) y caldo *Solanum tuberosum* 20% p/v + sacarosa 0.25% + Trp 0,2% de la composición.

La Figura 2 evidencia que los microorganismos de los géneros *Stenotrophomonas* y *Enterobacter* producen mayor cantidad de derivados indólicos por separado y en cocultivo en el caldo nutritivo comercial. Sin embargo, cuando se evalúa la producción de derivados indólicos del consorcio seleccionado, la producción de los compuestos de interés en el caldo nutritivo cae por debajo de la concentración de ácido indol acético observada en el medio *Solanum tuberosum* según la presente invención. Lo anterior evidencia que dicho medio promueve un rendimiento estable en la producción de derivados indólicos en presencia del consorcio completo.

5. Ensayo de inoculación de maíz bajo condiciones de invernadero.

Se evaluó el efecto de la inoculación de los microorganismos que hacen parte del consorcio (*Enterobacter*, *Stenotrophomonas* y *Serratia*), en un consorcio fresco y dos lotes con 24 meses y 8 meses de antigüedad.

El ensayo de inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal se estableció con semillas de maíz bajo condiciones de invernadero. El sustrato de siembra fue una mezcla de suelo-arena cuarcítica en proporción 1:1. Se aplicó NPK como control de fertilización y en los tratamientos control se regó solamente con agua de llave. La evaluación se realizó 60 días después de la siembra.

El ensayo se realizó bajo un diseño de bloques al azar en 4 bloques, 9 tratamientos y 4 réplicas por tratamiento. Cada producto se diluyó en tres partes de agua y se aplicaron 10 ml de inoculante por planta. Las variables evaluadas fueron: peso fresco aéreo y de las raíces, y longitud de raíces.

En la Figura 3 se presentan los datos de la longitud de raíces. El ANOVA arrojó diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p= 0.01848$). La alta variación evidenciada en dicha variable señala una tendencia creciente en la longitud de las raíces cuando las plantas son expuestas a la composición de la presente invención.

En las Figuras 4 y 5 se presentan los datos de peso fresco aéreo (PFA) y peso fresco de las raíces (PFR), en donde se muestra que las plantas inoculadas con el producto fresco de acuerdo con la presente invención presentaron el mayor crecimiento. Se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos para el PFV y PFR ($p= 1.893e-05$; $p=0.0005928$ respectivamente).

El comportamiento de las variables de crecimiento evaluadas en todos los casos es mejor cuando se utiliza el producto en formulación comercial.

6. Efecto del concentrado bacteriano de cultivos puros y de combinaciones de las cepas del consorcio, resuspendidos en buffer salino fosfato sobre plantas de Pino Caribe.

5 El consorcio de la presente invención puede ser formulado en complemento con fertilizantes químicos. A fin de evaluar la actividad del consorcio seleccionado en la presente invención y de las cepas del mismo, en presencia de fertilizantes químicos se diseñó un ensayo en bloques completos al azar, con 4 bloques, 10 tratamientos y 10 réplicas por tratamiento.

10

Tratamientos

T1. Bacteria solubilizadora de fósforo perteneciente al género *Enterobacter* + Fertilización 75%

15 T2. Bacteria productora de derivados indólicos perteneciente al género *Stenotrophomonas* + Fertilización 75%

T3. Bacteria productora de sideróforos perteneciente al género *Enterobacter* + Fertilización 75%

T4. Bacteria fijadora de nitrógeno perteneciente al género *Serratia* + Fertilización 75%

20 T5. Bacteria solubilizadora de fósforo perteneciente al género *Enterobacter* + Bacteria productora de derivados indólicos perteneciente al género *Stenotrophomonas* + Fertilización 75%

T6. Bacteria solubilizadora de fósforo perteneciente al género *Enterobacter* + Bacteria productora de derivados indólicos perteneciente al género *Stenotrophomonas* + Bacteria

25 productora de sideróforos perteneciente al género *Enterobacter* + Bacteria fijadora de nitrógeno perteneciente al género *Serratia* + Fertilización 75%

T7. Sin Bacteria + Fertilización 75%

T8. Sin Bacteria + Fertilización 100%

T9. Sin Bacteria + Fertilización 75% + PBS

30 T10. Sin Bacteria + Fertilización 100% + PBS

Cada una de las cepas bacterianas a evaluar se sembraron en caldo nutritivo. Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se realizaron tres

lavados del pellet con solución salina al 0,85%, centrifugando en cada uno de los lavados a las condiciones anteriormente mencionadas.

El concentrado bacteriano obtenido se diluyó en 400mL de una solución buffer fosfato salino (PBS) al 0,2M pH 7 (2,7218g/100mL KH₂PO₄, 3,484g/100mL K₂HPO₄, relación 1:1). La concentración final de cada uno de los inoculantes se determinó por conteo en cámara de Neubauer (Tabla 6).

Tabla 3. Concentración de inoculantes bacterianos utilizados para el montaje del ensayo de inoculación en plantas de *Pinus caribaea*.

INÓCULO	UFC/mL
Cepa solubilizadora de fósforo perteneciente al género <i>Enterobacter</i>	2,3 x 10 ⁸
Cepa productora de derivados indólicos perteneciente al género <i>Stenotrophomonas</i>	3,6 x 10 ⁸
Cepa productora de sideróforos perteneciente al género <i>Enterobacter</i>	1,7 x 10 ⁸
Cepa fijadora de nitrógeno perteneciente al género <i>Serratia</i>	5,3 x 10 ⁸
Cepa solubilizadora de fósforo perteneciente al género <i>Enterobacter</i> + Cepa productora de derivados indólicos perteneciente al género <i>Stenotrophomonas</i>	6,9 x 10 ⁸
Consorcio	6,4 x 10 ⁸

Se utilizaron plantas *Pinus caribaea* obtenidas a partir de semillas 21 días después de la siembra, en bolsas de polipropileno negras de 10cmx4cm (una planta por bolsa) con capacidad de 100g de sustrato de siembra que fue corteza del mismo pino molida y compostada. Cada una de las plantas fue inoculada con 10mL del inóculo a una concentración de 10⁸UFC/mL de acuerdo al tratamiento. Se realizaron cuatro controles sin inoculación bacteriana, correspondiente a los dos niveles de fertilización y la presencia de PBS. Para los controles de PBS se adicionó la misma cantidad que la del inóculo bacteriano.

Tabla 4. Aportes nutricionales de fertilizaciones químicas del ensayo de inoculación en Pino Caribe bajo condiciones de vivero.

Nutrientes (mg/planta)	Aplicación 1		Aplicación 2		Aplicación 3		Aplicación 4	
	100%	75%	100%	75%	100%	75%	100%	75%
N Total	0,3240	0,2430	0,6480	0,4860	0,9720	0,7290	1,2960	0,9720
P ₂ O ₅	0,8280	0,6210	1,6560	1,2420	2,4840	1,8630	3,3120	2,4840
K ₂ O	0,4500	0,3375	0,9000	0,6750	1,3500	1,0125	1,8000	1,3500
Mg ⁺⁺	0,3600	0,2700	0,7200	0,5400	1,0800	0,8100	1,4400	1,0800
S	0,4230	0,3173	0,8460	0,6345	1,2690	0,9518	1,6920	1,2690
Cl ⁻	0,0450	0,0338	0,0900	0,0675	0,1350	0,1013	0,1800	0,1350
Ca ⁺⁺	0,2520	0,1890	0,5040	0,3780	0,7560	0,5670	1,0080	0,7560
B ⁺⁺⁺	0,0036	0,0027	0,0072	0,0054	0,0108	0,0081	0,0144	0,0108
Cu ⁺⁺	0,0054	0,0041	0,0108	0,0081	0,0162	0,0122	0,0216	0,0162
Fe ⁺⁺	0,0090	0,0068	0,0180	0,0135	0,0270	0,0203	0,0360	0,0270
Mn ⁺⁺	0,0144	0,0108	0,0288	0,0216	0,0432	0,0324	0,0576	0,0432
Mo ⁺⁶	0,0007	0,0005	0,0014	0,0011	0,0022	0,0016	0,0029	0,0022
Zn ⁺⁺	0,0117	0,0088	0,0234	0,0176	0,0351	0,0263	0,0468	0,0351
Conductividad eléctrica (dS m ⁻¹)	1,96	1,64	3,19	2,47	4,61	3,89	4,27	3,67
Potencial Osmótico (MPa)	-0,071	-0,059	-0,115	-0,089	-0,166	-0,140	-0,154	-0,132
pH solución	7,46	7,5	7,18	7,28	6,68	6,77	6,91	6,87
Total (mg/planta)	2,73	2,05	5,45	4,09	8,18	6,14	10,91	8,18

5 A los 60 días después de la aplicación de los tratamientos se presentaron diferencias significativas (p=0,0016) entre ellos sobre la altura de las plantas (Figura 6).

Según la prueba de Duncan, la inoculación de la mezcla de las cuatro cepas bacterianas con el 75% de la fertilización química (T6) y el nivel de fertilización del 100% sin la
10 inoculación bacteriana (T8) (control positivo) presentaron la mayor respuesta para esta variable, con valores promedio de 12,4 ± 1,8 cm y 12,2 ± 2,5 cm respectivamente.

A los 90 días después de la aplicación (Figura 7), hubo diferencias significativas entre tratamientos para el diámetro del tallo (p=0,0017), y para la altura de la planta *Pinus*
15 *caribaea* (p=0,0000). Según la prueba de Duncan, la inoculación de la mezcla de las cuatro cepas bacterianas con el 75% de la fertilización química (T6), presentó la mayor respuesta para estas variables, con valores promedio de 2,03 ± 0,28 mm y 16,8 ± 2,8 cm respectivamente.

Después de 120 días desde la siembra (Figura 8), y en el momento de su trasplante a parcela definitiva, se realizó la evaluación general del ensayo. La altura de la planta presentó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p=0.005$).

- 5 Para todas las variables de la parte aérea de la planta, el tratamiento 6 que corresponde a la inoculación del consorcio bacteriano presentó la mayor respuesta, con un valor promedio para la altura de la planta de $18,1 \pm 2,7$ cm. La inoculación con la cepa bacteriana productora de sideróforos, perteneciente al género *Enterobacter* T3, presentó la menor respuesta para las variables diámetro del tallo y altura de la planta, con un valor
- 10 promedio para la altura de la planta de $13,9 \pm 1,9$ cm (Figura 7).

Crecimiento de raíces

- De acuerdo con el ANOVA, no se presentaron diferencias significativas entre
- 15 tratamientos para la longitud de la raíz ($p=0,1136$), ni para el peso seco de la raíz ($p=0,9989$) de las plantas *Pinus caribaea*. Sin embargo, el tratamiento 1 correspondiente a la inoculación de la cepa solubilizadora de fósforo perteneciente al género *Enterobacter* con el 75% de la fertilización química generó la mayor respuesta para estas variables, con valores promedios de $27,8 \pm 12,5$ cm y $0,13 \pm 0,07$ g, respectivamente.

20

Fósforo foliar

- Para el contenido de fósforo foliar, la prueba Duncan generó tres grupos homogéneos dentro de los tratamientos evaluados, siendo la inoculación con la cepa bacteriana
- 25 fijadora de nitrógeno perteneciente al género *Serratia* y el cocultivo de las cepas solubilizadoras de fósforo pertenecientes al género *Enterobacter*+las cepas productoras de derivados indólicos *Stenotrophomonas*, las que presentaron una mayor respuesta en la acumulación de fósforo en los tejidos foliares de plantas *Pinus caribaea*, con valores promedios de $0,25 \pm 0,08\%$ y $0,24 \pm 0,07\%$, respectivamente. El tratamiento 7 que
- 30 corresponde al 75% de la fertilización química sin inoculante bacteriano presentó la menor respuesta a esta variable con un valor promedio del $0,17 \pm 0,04\%$.

De acuerdo con lo anterior, la composición de acuerdo con la presente invención permite reducir el uso de los productos de síntesis química logrando indicadores de crecimiento similares o mayores al tratamiento con fertilización química.

FIGURAS

Figura 1.

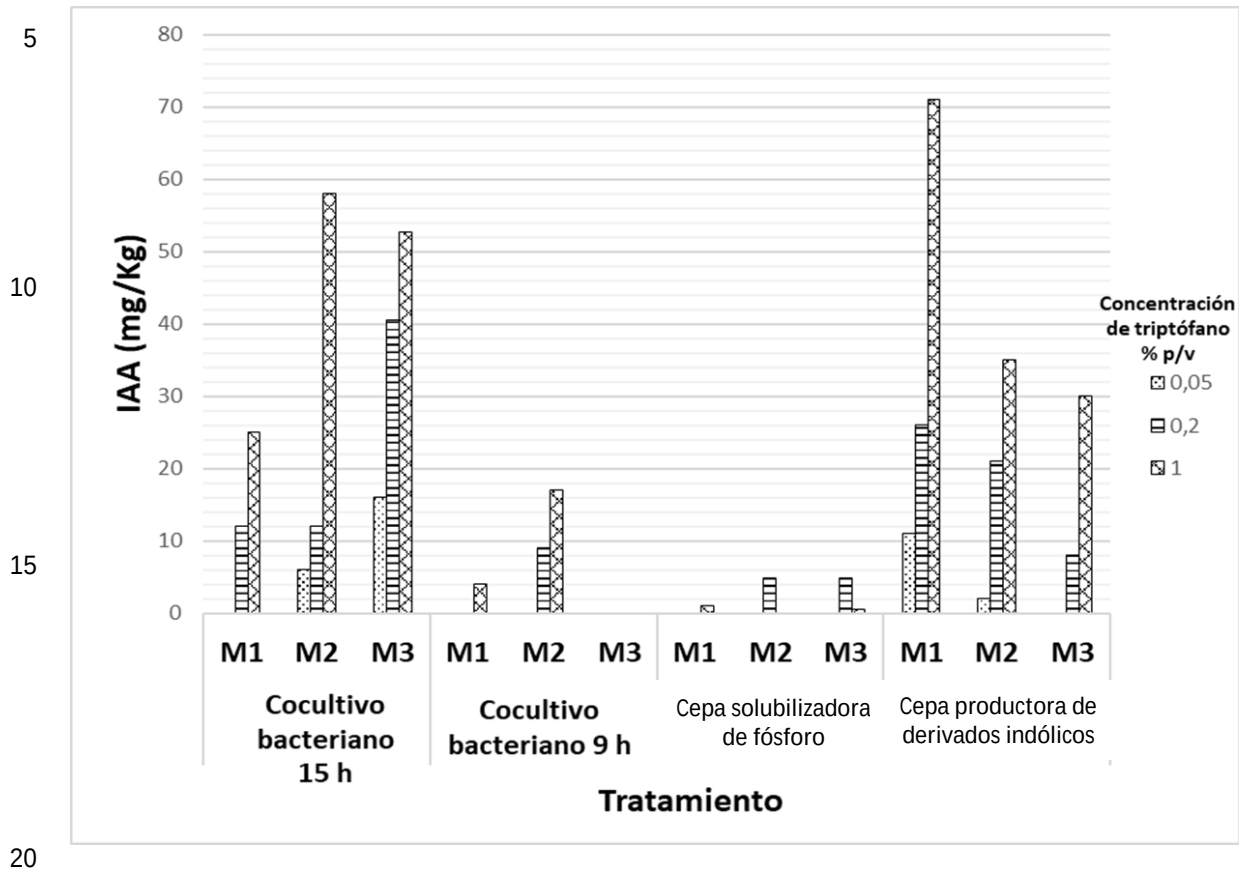


Figura 2.

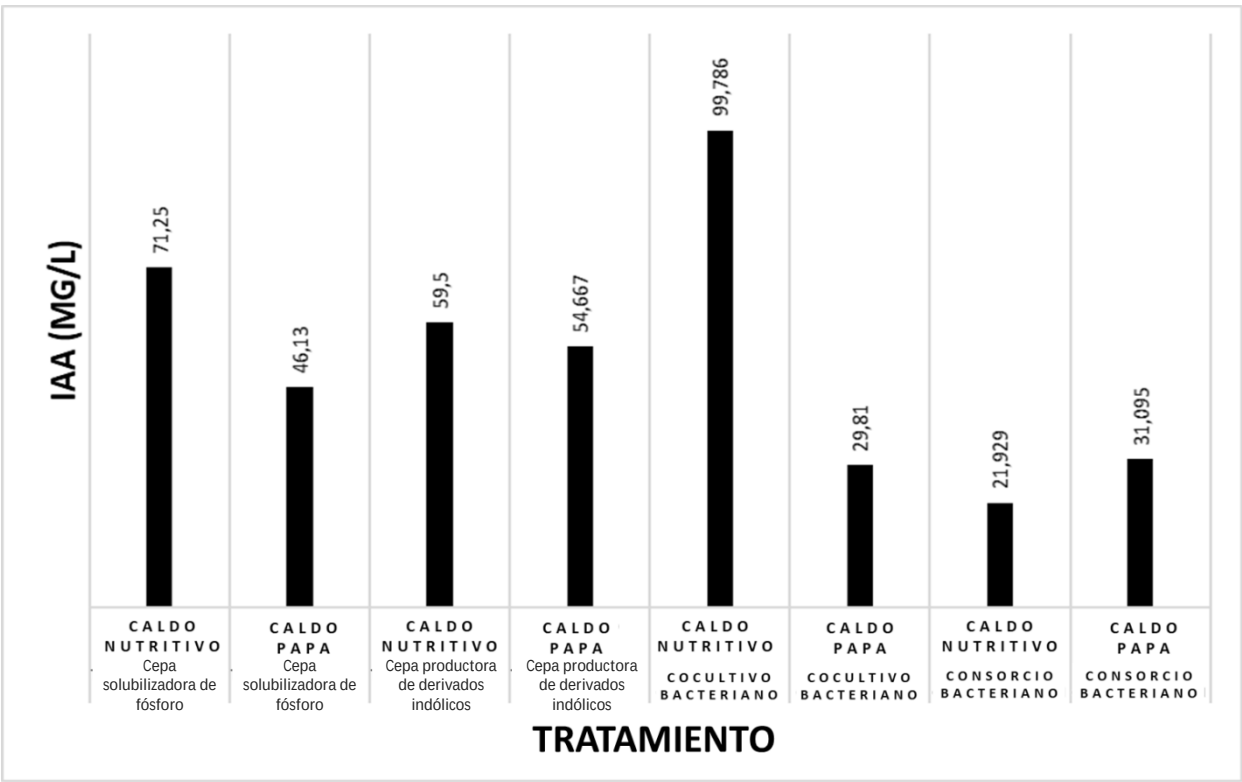


Figura 3.

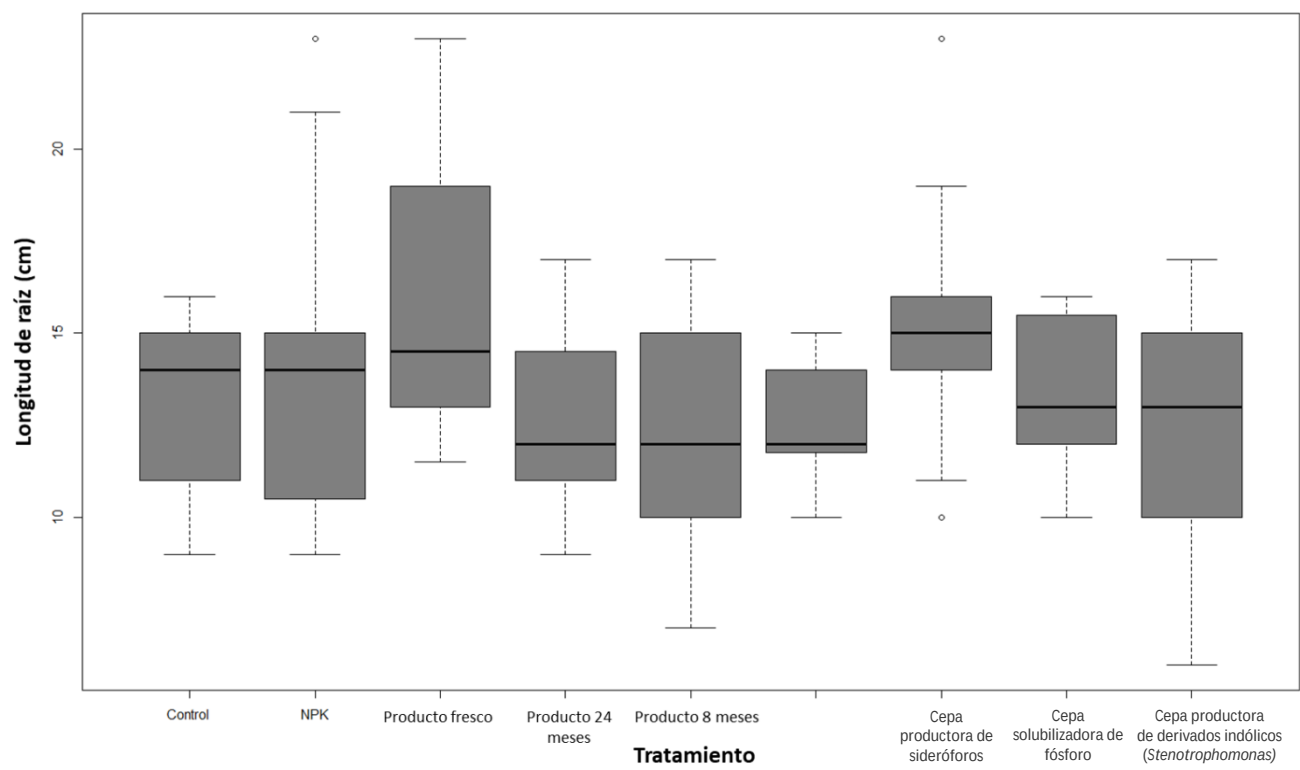


Figura 4.

5

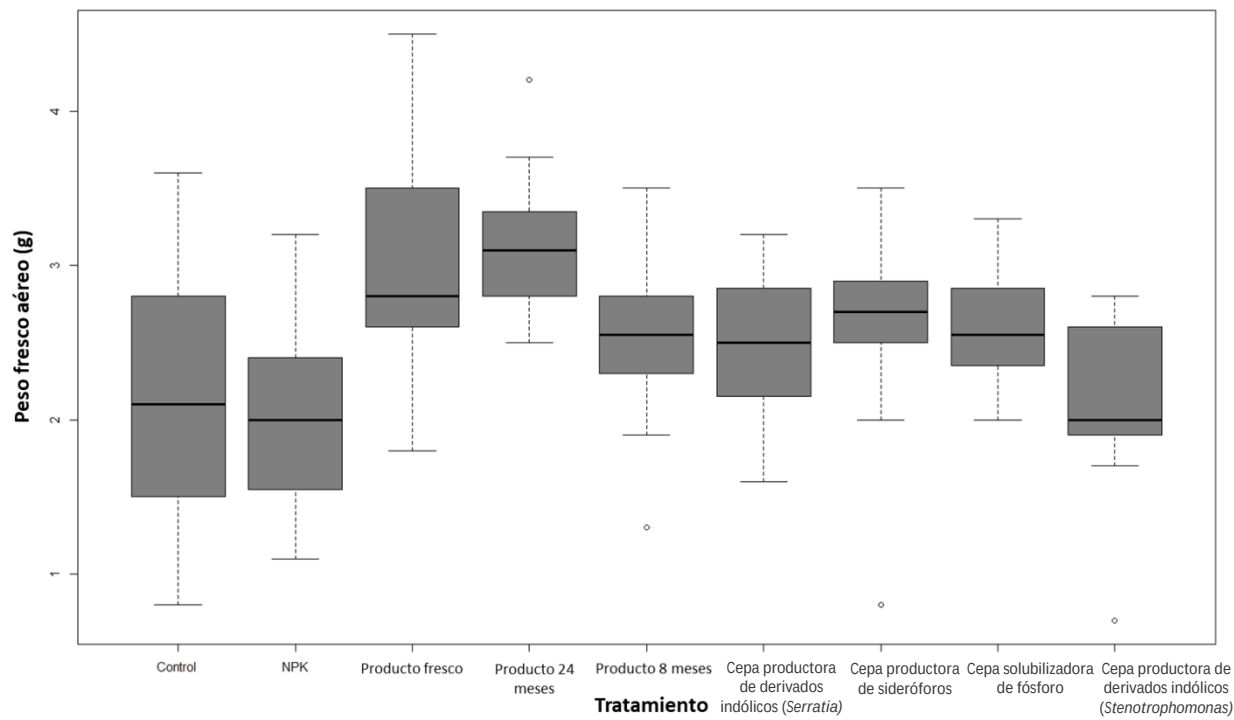


Figura 5.

5

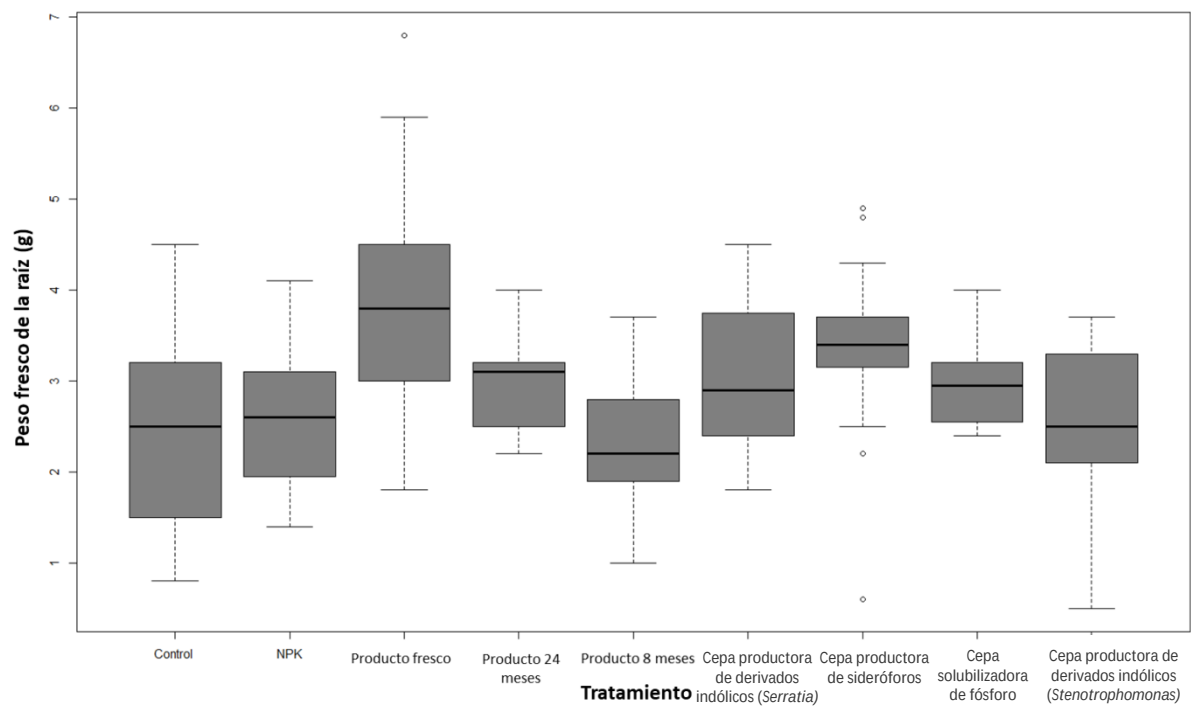


Figura 6.

10

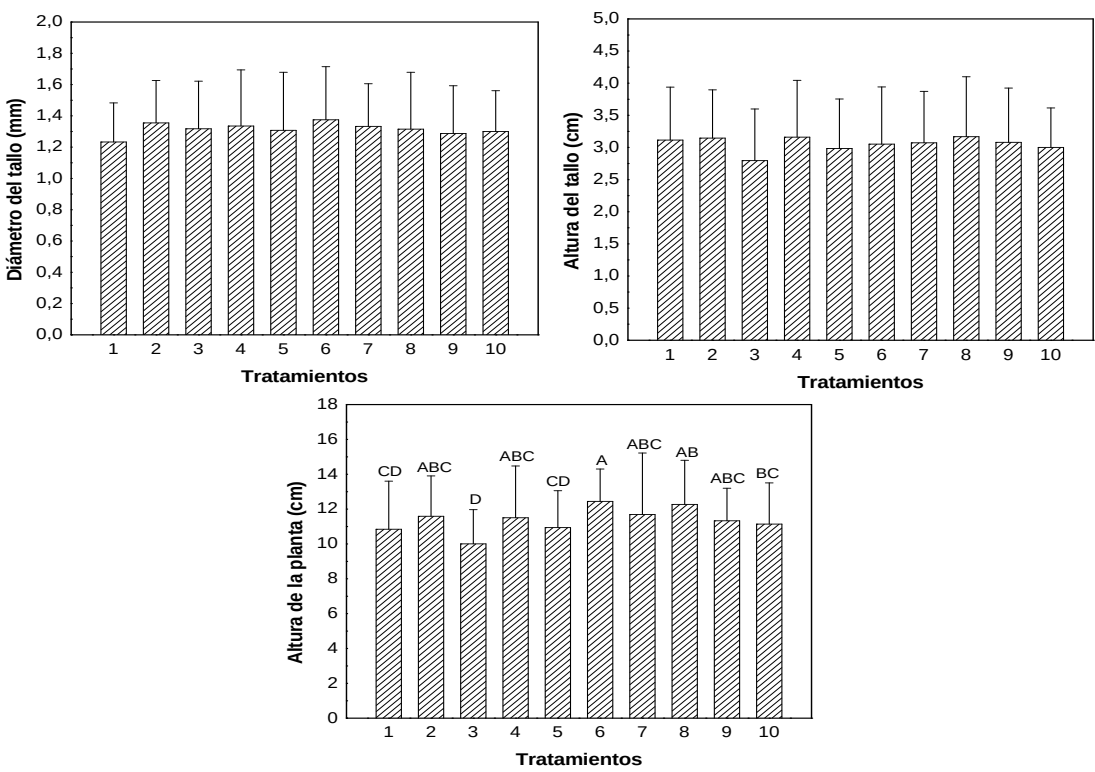


Figura 7.

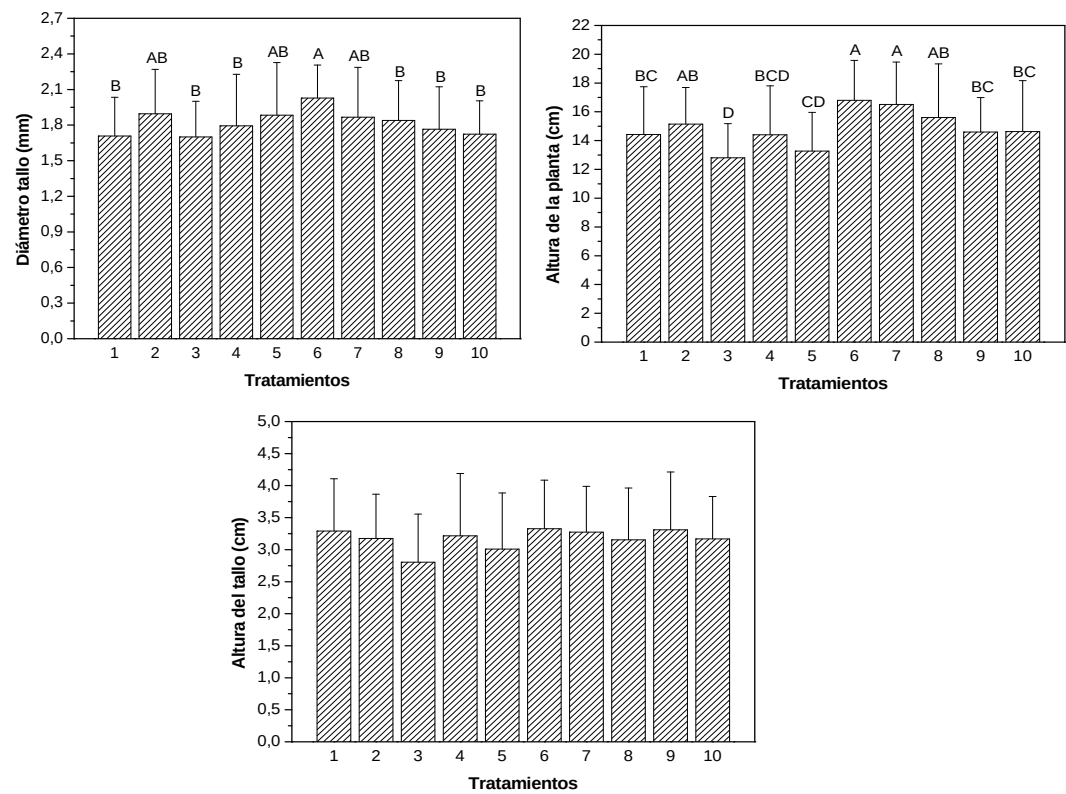
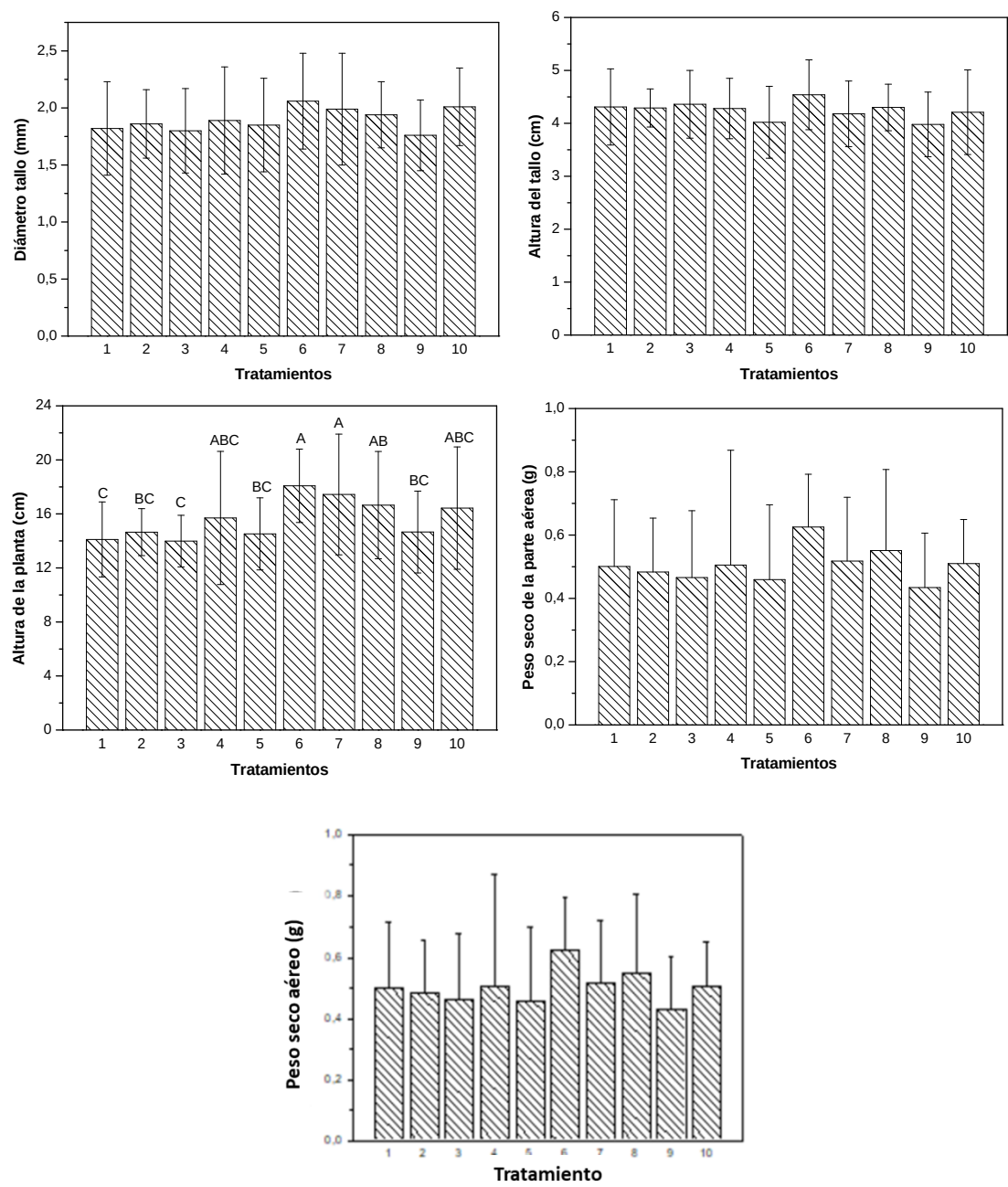


Figura 8.



5

10

15