



**Utilización de consorcios bacterianos para la germinación y
establecimiento de semillas de tomate, utilizando como
soporte alperujo y sustrato inerte.**

Trabajo Final de Graduación para obtener el título de **Licenciado en Biología**

BUENO RUFFA, JUAN GABRIEL

Director de tesis: **Dr. PAROLDI, HÉCTOR EMILIO**

Co-director de tesis: **Dr. VÁZQUEZ, FABIO, Mg. LAURA RODRIGUEZ**

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES (FCEFyN)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN JUAN (UNSJ)

San Juan, Argentina

Índice

Resumen	1
1. Introducción.....	2
1.1 Horticultura en la provincia de San Juan	2
1.2 El cultivo de tomate y su importancia.....	2
1.3 Situación del cultivo de tomate en San Juan	3
2. Formas de Producción hortícolas	1
2.1 El uso de fertilizantes	1
2.1.1 Tecnologías alternativas de fertilización	2
2.1.2 El uso de Biofertilizantes.....	3
2.2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB)	3
2.2.1 Género <i>Azospirillum</i>	4
2.2.2 Patogenicidad bacteriana	4
2.3 Problemáticas del árido para la aplicación de bioinoculantes PGPB	5
2.3.1 Enmienda orgánica del suelo e importancia del uso del alperujo en San Juan	5
2.3.2 Relevancia del estudio.....	7
3. Hipótesis.....	8
3.1 Objetivo	8
3.2 Objetivos específicos.....	8
4. Materiales y métodos.....	8
4.1 Origen y caracterización de los microorganismos.....	8
4.2 Ensayos de laboratorio.....	9
4.2.1 Tolerancia de crecimiento de los consorcios bacterianos en presencia de alperujo.9	
4.2.2 Evaluación <i>in vitro</i> de fitopatogenicidad a los consorcios bacterianos	9
4.2.3 Evaluación de la fitotoxicidad del soporte suplementado con alperujo fresco y fermentado	11
4.3 Pruebas en condiciones controladas de invernadero.....	11
4.3.1 Evaluación de parámetros de emergencia de brotes y establecimiento de la plántula de tomate.....	11
4.4 Monitoreo de las comunidades microbianas.....	12
4.5 Análisis estadísticos	13
5. Resultados.....	1
5.1 Tolerancia de consorcios bacterianos al alperujo	1
5.2 Fitopatogenicidad bacteriana <i>in vitro</i>	2
5.3 Fitotoxicidad del alperujo <i>in vitro</i> en base al índice de germinación (IG).....	3

5.4	Ensayos <i>in vivo</i> en plantas de tomate.....	3
5.4.1	Datos vegetativos.....	3
5.5	Recuentos microbianos.....	7
5.6	Interacción entre las diferentes variables analizadas y los tratamientos.....	10
6.	Discusión.....	11
6.1	Evaluación de fitotoxicidad y fitopatogenicidad en <i>Raphanus sativus</i> (rabanito).....	11
6.2	Variables medidas en tomate.....	12
6.2.1	Peso seco.....	12
6.2.2	Altura del tallo.....	14
6.2.3	Área total de las hojas verdaderas.....	15
6.3	Variables microbiológicas.....	16
6.3.1	Número de UFC de hongos.....	16
6.3.2	Número de UFC de levaduras.....	17
6.3.3	Número de UFC de <i>Azospirillum</i> sp.....	17
6.4	Asociación entre las diferentes variables analizadas y los tratamientos.....	18
7.	Conclusiones.....	19
8.	Proyecciones.....	1
9.	Bibliografía.....	1

Resumen

En la provincia de San Juan los cultivos hortícolas se desarrollan bajo sistemas de manejo agrícola del tipo intensivo. Uno de los principales cultivos es el tomate (*Solanum lycopersicum*) para industria, cuya producción en la provincia, es la principal del país. Este cultivo desde sus comienzos fue y es de suma importancia, constituyendo un componente principal en la alimentación de muchos países, es ésta la principal razón de que su producción aumente año a año. Desde los últimos años, nuevas tendencias en la alimentación, o estilo de vida orgánicos y naturales, hace que esté cobrando importancia el cultivo de tomates con fines distintos al de industrialización y con otros manejos como el invernadero o carpas *indoor* de autocultivo. En lo que respecta a su forma de cultivo intensivo, en el contexto provincial, es necesaria la utilización de fertilizantes, pero los mismos pueden ocasionar problemas ambientales relacionados principalmente, con los recursos hídrico y edáfico. Una alternativa al uso de agroquímicos que contaminan al medio ambiente, es el uso de biofertilizantes. Estos últimos son sustancias que contiene microorganismos o metabolitos producidos por ellos, que al relacionarse con las plantas causan un efecto benéfico para su crecimiento, desarrollo y permiten el enriquecimiento y la conservación de los suelos. En base a esto, pueden nombrarse algunas bacterias que cumplen la función de enriquecimiento del suelo, aportando materia orgánica por ejemplo, y promoviendo el crecimiento y desarrollo vegetal, denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Plant Growing Promotional Bacteria* PGPB). *Azospirillum sp.* es un género de α -Proteobacterias, de la familia *Rhodospirillaceae* y actualmente de los géneros más estudiados con características PGPB. Uno de los problemas en los suelos de San Juan al utilizar bacterias PGPB como alternativa biofertilizante, es el bajo contenido de materia orgánica necesario para el desarrollo de estos microorganismos. Una manera de mejorar esta condición edáfica es utilizar una enmienda orgánica (cualquier material de origen animal o vegetal) que adicionada al suelo mejore sus propiedades físicas y/o químicas. Ejemplo de ello pueden ser un residuo crudo de la industria del aceite de oliva como el alperujo (AL). Según antecedentes, su aplicación a cultivos en dosis preestablecidas genera efectos positivos en la calidad del recurso edáfico. La olivicultura y la producción de aceite es una de las principales actividades económicas que se realizan en San Juan, siendo sus residuos un problema para los productores y las unidades de gestión ambiental, por su disposición final dificultosa y costosa. Por este motivo es importante conocer cómo actúan un biofertilizantes compuesto por PGPB del género *Azospirillum* en conjunto con una enmienda orgánica cruda (alperujo) en el suelo. Para esto se realizaron ensayos a escala de laboratorio *in-vitro* e *in-vivo* evaluando 2 consorcios bacterianos del género *Azospirillum* en combinación con alperujo en proporciones de 5% y 15%, sobre un sustrato inerte. Se evaluaron aspectos microbiológicos y vegetativos de platines de tomate. Los resultados mostraron que el alperujo en combinación con dicho biofertilizante, promueve la biodiversidad microbiana de grupos funcionales de hongos, levaduras y bacterias, evidenciando mejoras en el crecimiento y desarrollo vegetativo en los tratamientos con concentraciones bajas de alperujo al 5% e inoculantes bacterianos.

1. Introducción

1.1 Horticultura en la provincia de San Juan

En la provincia de San Juan la producción vegetal se realiza bajo riego en los oasis de los Valles centrales (Tulum y Ullúm-Zonda) y perimetrales (Calingasta, Iglesia, Jáchal y Valle Fértil), donde reviste de gran importancia económica y social, por ser una actividad que necesita numerosa mano de obra. La superficie hortícola provincial cultivada es aproximadamente 10.000 ha de las 700.000 cultivadas que hay en Argentina (Áreas de riego en la provincia de San Juan, 2006-2007; IPP, 2016; Cuestas *et al.*, 2020)

La mayor parte de la superficie hortícola se destina a la producción de ajo, cebolla, tomate perita para industria, melón y zapallo. Se trata de emprendimientos en los cuales los productores se dedican exclusivamente a dicho cultivo y poseen establecimientos de dimensiones variables (IPP, 2016).

Las condiciones climáticas que caracterizan la provincia de San Juan, como la baja humedad relativa y precipitaciones que en promedio rondan sobre los 100 mm anuales, definen un clima seco que dificulta el desarrollo de algunas plagas. La temperatura media anual es de 25°C, veranos cálidos de 34°C e inviernos fríos de 9°C en promedio. La alta heliofanía (horas de sol) es otro de los factores que la caracterizan. San Juan se ubica en segundo lugar del país con 3176 horas de sol anuales, lo que se traduce en una mayor oferta energética para los cultivos. En resumen, la provincia reúne las condiciones aptas para el desarrollo de los cultivos anteriormente nombrados (IPP 2016; Atlas Socioeconómico Provincia San Juan).

1.2 El cultivo de tomate y su importancia

Sus formas cultivadas derivan de la especie *Solanum lycopersicum*. Esta es una planta nativa de América y sus orígenes provienen de dos centros: uno en la parte noroeste de Sudamérica, que se extiende en las zonas montañosas de Perú y Ecuador; otro en el imperio Azteca, en Tenochtitlan, lugar en el que los conquistadores españoles conocieron esta especie y la introdujeron a Europa. En ambos lugares hubo un proceso de domesticación (Torrico *et al.*, 2013).

El tomate (*S. lycopersicum*) es una de las especies económicamente más importante y más cultivada a nivel mundial. Su fruto constituye uno de los principales componentes de la alimentación diaria de la población de muchos países (Padilla-Bernal *et al.*, 2015). Luna-Guevara *et al.* (2014) afirman que su consumo regular se traduce en beneficios directos para la salud por la prevención de enfermedades de tipo crónico-degenerativas y cardiovasculares. Los responsables de estas propiedades en los frutos, son los compuestos antioxidantes, que comprenden: al licopeno, flavonoides, fenoles y vitaminas C y E.

La producción global del cultivo aumentó aproximadamente 300 % en las últimas cuatro décadas anteriores al 2015 (FAOSTAT, 2015). Además, la producción de tomate como negocio agrícola es una fuente importante de sustento en muchas regiones del mundo, ofreciendo un gran potencial para generar empleo (Padilla-Bernal *et al.*, 2015).

1.3 Situación del cultivo de tomate en San Juan

En los últimos años, San Juan se ha convertido en la región con más potencial del país para el cultivo de tomates para industria. Cuenta con alrededor de 2000 hectáreas cultivadas con tomate para industria, con rendimientos que alcanzan valores promedio de 110.000 kilos por hectárea, llegando a superar en algunos casos los 180.000 kilos por hectárea. Esto se debe a las buenas condiciones climáticas sumadas a la gran adopción de tecnología, entre las que se destacan el riego por goteo, el trasplante y la cosecha mecánica. En cuanto a la producción de tomate para consumo en fresco, se estima que existen en promedio 220 has cultivadas en la provincia. Aproximadamente el 65% del tomate para consumo en fresco sanjuanino se comercializa en los mercados concentradores provinciales y el 35% restante se envía a Mendoza, Córdoba, Buenos Aires y la Patagonia. En este cultivo, los productores apuntan a obtener color, tamaño grande y sabor de tomate. Esto es posible gracias a las características de la geografía sanjuanina: escasas lluvias, buena insolación, calidad de suelos y de agua (CFI, 2018; PACIT, 2017; IPPSJ, 2016)

2. Formas de Producción hortícolas

La horticultura, además de la producción a campo abierto, se practica sobre ambientes modificados, estructuras diseñadas especialmente para poder modificar las condiciones ambientales circundantes a la planta (López *et al.*, 2011). La agricultura protegida bajo estas estructuras permite minimizar las condiciones climáticas adversas para los cultivos (Moreno *et al.*, 2011). El cultivo protegido se define como: “aquel al cual, durante todo el ciclo de producción, o en una parte del mismo, se incorporan modificaciones que actúan acondicionando el microclima del espacio donde crecen las plantas” (Szczesny & Adlercreutz, 2014). En etapas tempranas del cultivo, muchos productores hortícolas tanto industriales como en un contexto de horticultura familiar, utilizan carpas *indoor* para los primeros estadios de los plantines, las cuales permiten un control ajustado de la temperatura, humedad y luminosidad (Zelkind, *et al.*, 2022).

2.1 El uso de fertilizantes

Las actividades agropecuarias en la provincia se realizan sobre la base de una agricultura intensiva, donde, para lograr competitividad es necesario el aporte de fertilizantes que incrementan la productividad y rentabilidad de los cultivos agrícolas. Según Salazar (1999) y García-Jiménez *et al.* (2008) su correcta aplicación en cantidades, momentos y sitios oportunos no dejan residuos en el medio, puesto que pasan a formar parte de los distintos constituyentes bioquímicos de la planta. No obstante, el uso inadecuado y el exceso, generan consecuencias graves para la salud y el medio ambiente (Cao *et al.*, 2022; Devi *et al.*, 2022).

El objetivo del uso de fertilizantes es obtener buen desarrollo de la planta, buenos rendimientos y prevenir daños al medio ambiente (Roberts, 2008). Su utilización se ve justificada ante el creciente aumento de la población mundial, ya que el cultivo del tomate es una de las bases para sostener el nivel de producción alimentaria. Se prevé que, en el 2050 los 7000 millones de personas estimados en el 2015, llegue a 9000 millones (FAO, 2015).

En la República Argentina la principal fuente de fertilización es de origen química. El incremento en el uso de fertilizantes químicos según International Fertilizer Association (2015) aumentó entre 30 y 40% en el periodo 1996-2015. Los efectos beneficiosos de

este tipo de fertilizantes ocultan los costos que conllevan y la contaminación que pueden ocasionar debido a su ineficiente y excesivo uso (Altieri, 2009). El modelo agrícola actual ejerce un gran impacto sobre las aguas superficiales y subterráneas debido al uso y abuso de estos compuestos químicos. Estos fertilizantes pueden causar eutrofización, ocasionando la muerte a todos los organismos acuáticos (Smith *et al.*, 2003; Sarandón *et al.*, 2014). Del mismo modo, la aplicación de fertilizantes causa modificaciones en determinados parámetros como el pH y conductividad eléctrica de los suelos, que conducen a cambios significativos en la composición de la comunidad microbiana del suelo (Steiner *et al.*, 2007). Además, dichos microorganismos son sensibles a compuestos activos de fungicidas y plaguicidas, representados por formulados derivados de diversos compuestos como: organoclorados, organofosforados, organosulfurados, carbomatos, entre otros (Sánchez *et al.*, 2016).

Por otro lado, las preocupaciones ambientales más importantes sobre el excesivo uso de fertilizantes se relacionan con riesgos para la salud humana, animal y vegetal, con pérdida de productividad y sustentabilidad por la contaminación del suelo y los cursos de agua con metales pesados (Londoño-Franco *et al.*, 2016). Los fertilizantes de origen químico son fuentes de metales pesados como plomo y cadmio que se acumulan en el suelo debido al sostenido uso de los mismos. Estos metales son tóxicos tanto para las plantas como para los seres humanos (Martí *et al.*, 2002). A causa de esto es que en la actualidad se están implementando alternativas tecnológicas de fertilización más amigables con el medio ambiente.

2.1.1 Tecnologías alternativas de fertilización

En sistemas agro-productivos de ambientes áridos, la aplicación de tecnologías de fertilización que involucren la conservación del recurso edáfico, son de gran interés debido a que estos suelos presentan estructura frágil, perfiles poco desarrollados, textura principalmente arenosa y un bajo contenido de materia orgánica (Pascual *et al.*, 1998; Stursova & Sinsabaugh, 2008). Dichas características los hacen muy vulnerables y propensos a la pérdida por degradación y a la lixiviación de los elementos móviles en cursos de agua.

Una alternativa para poder mitigar estas situaciones es el uso de estrategias biotecnológicas que promuevan la sustentabilidad ambiental, manteniendo o

incrementando los niveles de calidad y rendimiento de los cultivos (Santiago-López *et al.*, 2016). Algunas de estas estrategias, involucran el uso de microorganismos o de sus productos relacionados con finalidades agronómicas.

2.1.2 El uso de Biofertilizantes

El término "biofertilizante" ha sido definido de diferentes maneras durante las últimas décadas, lo que deriva en parte por la mejor comprensión de las relaciones que ocurren entre los microorganismos del suelo y la planta. Vessey (2003) lo define como una sustancia que contiene microorganismos vivos que, cuando se aplica en las semillas, las superficies de las plantas o el suelo, colonizan la rizósfera o el interior de la planta y promueve el crecimiento aumentando el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios a la planta huésped. Esta definición se basa en la lógica de que el término biofertilizante es una contracción del término fertilizante biológico.

El desarrollo de fertilizantes basados en microorganismos ha aumentado su demanda en todo el mundo por causa del conocimiento de los efectos nocivos de los fertilizantes de origen químico sobre el medioambiente y a la mejor información sobre las relaciones planta- microorganismos que ocurren en la rizósfera (Yadav & Sarkar, 2019; Mahapatra *et al.*, 2022). En distintas partes del mundo, investigadores aislaron y seleccionaron cepas microbianas que muestran la capacidad de promoción del crecimiento de plantas mediante la mejora directa y/o indirecta de la absorción de nutrientes (Cid, 2006; Ratón *et al.*, 2005).

2.2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB)

Las bacterias relacionadas con la fertilidad del suelo, la promoción y crecimiento de las plantas en general, se denominan bacterias promotoras del crecimiento vegetal, conocidas por sus siglas en inglés PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*). Se trata de microorganismos que se nutren de los exudados de las raíces, como azúcares, vitaminas, ácidos orgánicos, glúcidos y mucigel (Hernández & Escalona, 2003). Las PGPB son fundamentales en el reciclado de los nutrientes del suelo y, por consiguiente, son cruciales para la fertilidad del suelo (Glick *et al.*, 2012). Según se mencionó, se usan como bioinoculantes para mejorar el crecimiento y el rendimiento de los cultivos agrícolas (Ghevariya & Desai, 2014). Varias especies bacterianas que pertenecen a diversos géneros, por ejemplo, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, etc, están asociadas

con la rizósfera de la planta y pueden ejercer un efecto beneficioso sobre el crecimiento de la misma (Kumar *et al.*, 2012).

2.2.1 Género *Azospirillum*

Azospirillum es un género de α -Proteobacterias, de la familia *Rhodospirillaceae*, actualmente de los más estudiados con características PGPB (Coniglio, 2019). Son bacterias diazotróficas de vida libre, capaces de fijar nitrógeno en condiciones microaerofílicas. (Parra *et al.*, 2001; Pankiewicz *et al.*, 2015; Pereg *et al.*, 2016). Las especies de *Azospirillum* conocidas comprenden bacterias no patógenas para las plantas, sin embargo, pueden inducir mecanismos de defensa contra patógenos vegetales (Cassán *et al.* 2014). Las *Azospirillum* son bacterias de la rizosfera, y muestran un metabolismo versátil de carbono (C) y nitrógeno (N), lo que los hace adaptables para establecerse en el entorno competitivo de la rizósfera (Steenhoudt *et al.*, 2000).

De las especies descritas se menciona particularmente a *Azospirillum brasilense* que presenta una variedad de beneficios al ser aplicada en cultivos entre los que se destacan: capacidad de fijar nitrógeno, posibilidad de aumentar la actividad de nitrato reductasa, promoción de fitohormonas, promoción de la solubilidad de fosfatos, fomento de asociaciones micorrícicas beneficiosas, entre otras (Prisa, 2019).

2.2.2 Patogenicidad bacteriana

Si bien, las ventajas de la aplicación de bacterias PBPG para la fertilidad del suelo y, el crecimiento y desarrollo de las plantas son numerosas, en algunos casos pueden causar enfermedades en la planta (Saharan *et al.*, 2011). Este mecanismo suele asociarse a la producción de compuestos secundarios no deseados, y, la excesiva producción de ciertas fitohormonas desencadenan la inhibición de determinados tipos de crecimiento vegetal o promueven la actividad patógena de hongos en la rizosfera (Xie *et al.*, 1996; Dewey *et al.*, 1999).

Por lo expuesto, al momento de proponer la utilización de inóculos bacterianos como herramienta biofertilizante del suelo, es importante tener la precaución de realizar pruebas (anteriores a la utilización de los aislamientos o inóculos sobre las especies vegetales) como ensayos de fitopatogenicidad. En estas, se evalúan los posibles efectos

adversos en la germinación o desarrollo de plántulas durante los primeros días de crecimiento (Uribe, 2008). En esta prueba se utilizan semillas sensibles como las de Rabanito (*Raphanus sativus*) de rápido crecimiento, bajo costo y fácil manejo, con el fin de observar si hay producción y acción de sustancias fitotóxicas representadas como efectos negativos en la germinación o desarrollo, e inferir los resultados para otras especies vegetales (Luo *et al.*, 2017).

2.3 Problemáticas del árido para la aplicación de bioinoculantes PGPB

El bajo contenido de materia orgánica (MO) es otro de los grandes problemas ya mencionados a los que se enfrentan los suelos de los sistemas productivos del árido.

En los ambientes semiáridos, áridos e hiperáridos, el régimen escaso, variable e impredecible de las precipitaciones, sumado los agentes erosivos eólicos- fluviales y a la escasa cobertura vegetal, convierten a la disponibilidad de agua, la facilitación de nutrientes y el aporte de MO al suelo, en los factores más importantes que limitan el funcionamiento del ecosistema (Navas *et al.*, 2019). Estas condiciones, generan un ambiente desfavorable para el crecimiento microbiano masivo en el suelo, poniendo en riesgo la continuación de los biofertilizantes bacterianos PGPB que se utilicen (Aanderud *et al.*, 2013; Pavel *et al.*, 2004; Doyle *et al.*, 2006;).

2.3.1 Enmienda orgánica del suelo e importancia del uso del alperujo en San Juan

Una de las propuestas para mejorar la calidad del suelo en lo que respecta a su contenido de MO, es la aplicación o adición de algún tipo de enmienda orgánica. Esto es, adicionar cualquier material de origen animal o vegetal al suelo para mejorar sus propiedades físicas y/o químicas. Enmiendas como estiércol y residuos vegetales han sido usadas para incrementar la fertilidad de los suelos desde el principio de la producción agrícola (He y Zhang, 2014). Distintas publicaciones de diversos orígenes han reportado un creciente interés por el uso de materiales orgánicos (Soumare *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2004; Azeez y Van Averbeké, 2010; Mardomingo *et al.*, 2013), debido a que estos pueden mejorar propiedades físicas, químicas y microbiológicas, e incrementar la fertilidad del suelo (Abbasi y Khizar, 2012). Además, es una manera segura y eficaz de recuperación de nutrientes como

nitrógeno (N) y fósforo (P) para las plantas (Gilly y Eghball, 2002; Abbasi y Khizar, 2012)

En la provincia de San Juan, el cultivo de olivares para la producción de aceite es una de las principales actividades agrícolas. Según el Ministerio Nacional de Desarrollo y Producción 2019, San Juan representa el 17% de la superficie cultivada del país actualmente (Carciofi *et al.*, 2022) con una superficie de 610.600 ha. En el 2019, la provincia exportó 8.011Tn netas de aceite de oliva (Informe Olivícola FAO 2019).

El sistema de extracción de aceite de oliva que predomina en la actualidad, es mediante centrífugas de dos fases que no incorpora agua en el proceso. En éste, se obtienen dos fases: una oleosa, principalmente aceite y otra residual, semisólida denominada alperujo (AL). El alperujo (AL) es un material lignocelulósico, semisólido (55 % – 80 % de humedad), que representa un 35-40% total de peso de la aceituna (Chanioto *et al* 2018), de color oscuro, pH ácido, con contenido graso 1.9 - 8.1 % de Grasa/sólido húmedo, con una materia orgánica total 90 a 95 % que incluye polialcoholes, pectinas, azúcares, carbohidratos, taninos y compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos presentes en el alperujo desempeñan importantes funciones fisiológicas en los vegetales, sobre todo en los primeros estadios fenológicos. En general y debido a su condición de polifenoles se oxidan con mucha facilidad y actúan como antioxidantes. Entre otras funciones, también se han encontrado compuestos fenólicos del alperujo que inhiben la germinación de semillas, la expansión de hojas, la fotosíntesis, la absorción de nutrientes y la acumulación de materia seca en vástagos y raíces de plantas, por eso sus propiedades fitotóxicas (Sanchez *et al.*, 2013).

Actualmente en la provincia, se producen aproximadamente 40.720 Tn de alperujo, las cuales son necesarias tratar para dar disposición final segura. Como alternativas de tratamiento se pueden mencionar: secado para segunda extracción de aceite, utilizando solventes inorgánicos, disposición en piletas para evaporación natural, co-compostaje, y aplicación directa en suelo en concentraciones bajas (como práctica sugerida) (Monetta *et al.*, 2017).

Se ha reportado que la aplicación de alperujo como enmienda orgánica del suelo, causa incrementos en el contenido de materia orgánica disponible, y el nivel de macronutrientes como fósforo asimilable, nitrógeno total y potasio intercambiable (Altieri

y Esposito, 2008; Kavdir y Killi, 2008; Lopez-Pineiro et al., 2008; Aguilar, 2009; Paroldi et al., 2015). Los cambios de carácter químico y físico tras la aplicación de enmiendas alteran la microbiota del suelo a nivel poblacional y metabólico (Bastida et al., 2008; Abubaker et al., 2013). La estructura de las poblaciones microbianas puede modificarse debido a que se promueve el crecimiento de algunos grupos microbianos presentes ya en el suelo o bien porque son introducidos con las enmiendas (Ros et al., 2003; Jangid et al., 2008; Bastida et al., 2008). En algunos trabajos se registró que en suelos en los que se aplicó alperujo, aumentaron las actividades metabólicas, comprendidas por las actividades enzimáticas asociadas a los ciclos del carbono (β -glucosidasa), fósforo (fosfatasa) y azufre (arilsulfatasa) (Lopez-Pineiro et al., 2011). Los suelos enmendados con este residuo, presentaron cambios en su composición taxonómica, pero estos cambios no afectaron el funcionamiento metabólico del suelo (Karpouzias et al., 2010). De acuerdo a la elevada relación C/N, algunos autores sugieren que el nitrógeno mineral es inmovilizado no quedando disponible para el cultivo (Perucci et al., 2006). Esta relación, produce una reacción de demanda de N, que se puede corregir con una fuente externa de dicho mineral (Ordoñez et al., 1999; Cabrera et al., 2002).

2.3.2 Relevancia del estudio

Si bien existen trabajos en los cuales se utilizaron residuos crudos provenientes de la olivicultura, como el alperujo y sus derivados, como enmienda orgánica (Paroldi et al. 2015; El Hassani et al., 2010; Peña et al. 2019) y también existen estudios que evidencian a *Azospirillum* sp. como una bacteria PGPB para cultivos hortícolas (El-Beltagi et al. 2022; Andrade-Sifuentes et al. 2020; Reddy et al. 2018), no se encuentran en la literatura trabajos que evalúen la aplicación conjunta del alperujo como enmienda de suelos en combinación con consorcios de bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Teniendo en cuenta que la provincia de San Juan presenta condiciones climáticas desfavorables para los cultivos tradicionales, sumados a suelos frágiles y poco desarrollados, surge la necesidad de promover prácticas agrícolas sustentables, que impliquen el uso de nuevas tecnologías, tendientes a preservar y/o mejorar las características asociadas a la calidad de suelo, sin perjudicar la productividad de los cultivos.

Frente a esta situación, en esta tesina de grado se plantea la siguiente hipótesis y objetivo:

3. Hipótesis

La utilización de inoculantes biológicos constituidos por microorganismos benéficos para las plantas, en asociación con una enmienda orgánica, favorecerá de manera conjunta el crecimiento vegetal.

3.1 Objetivo

Evaluar la utilización de consorcios bacterianos PGPB en combinación con un residuo orgánico crudo (alperujo), en función de parámetros de calidad microbiológicos y agronómicos, en crecimiento de plantines de tomate.

3.2 Objetivos específicos

- Seleccionar consorcios bacterianos con propiedades PGPB.
- Evaluar los diferentes consorcios bacterianos en pruebas de tolerancia a diferentes concentraciones de alperujo.
- Seleccionar los consorcios con mejor eficacia de crecimiento para ser utilizados en la inoculación de sustratos.
- Preparar el soporte para la prueba de germinación en las concentraciones de baja toxicidad.
- Sembrar las semillas e incubar con solución de inoculante bacteriano, en sustratos inertes con diferentes concentraciones de alperujo fresco.

4. Materiales y métodos

4.1 Origen y caracterización de los microorganismos

Los consorcios bacterianos que se emplearon en el presente trabajo, pertenecen al cepario del Instituto de Biotecnología. Estos consorcios son un conjunto de bacterias pertenecientes al género *Azospirillum sp.*, que fueron aislados utilizando medios selectivos como lo hace Alef & Nannipieri (1995). Los consorcios fueron obtenidos de diferentes sitios de estudio (humedales y zonas áridas) de la localidad de la ciénaga en el departamento de Jáchal, de la provincia de San Juan. Posteriormente fueron caracterizados en función de las características PGPB que presentaban en condiciones

de laboratorio. Dentro de estas características cabe destacar la producción por parte de estos microorganismos de fitohormonas (auxinas) y otros compuestos relacionados con la solubilidad del fósforo y la captación de hierro. Además, algunos de estos consorcios presentaron efectos positivos en el antagonismo de hongos fitopatógenos. El aislamiento y la evaluación de dichos consorcios se realizó en el marco del trabajo final de licenciatura de la Lic. Ana Clara Visconti Buttiero (Visconti Buttiero A, 2021).

4.2 Ensayos de laboratorio

4.2.1 Tolerancia de crecimiento de los consorcios bacterianos en presencia de alperujo

En placas de Petri estériles de 90x15mm, con agar nutritivo y concentraciones crecientes de alperujo (5, 15 y 25%), con una espátula de Drigalsky, se sembraron inóculos de los consorcios bacterianos. Posteriormente se incubaron en estufa con las siguientes condiciones: temperatura 29°C, humedad 60% y a las 48 horas se observó a través de la placa el desarrollo de los 6 consorcios.

4.2.2 Evaluación *in vitro* de fitopatogenicidad a los consorcios bacterianos

Se evaluó *in vitro* fitopatogenicidad de los seis consorcios pertenecientes al género *Azospirillum* con características PGPB.

Este ensayo se basa en el índice de germinación de semillas sensibles (Villegas *et al.*, 2011). Se utilizaron semillas de rabanito (*Raphanus sativus* L.). Actualmente el conocimiento del genoma de esta planta, como así también su rápido crecimiento y fácil manejo, la convierte en un buen modelo para análisis científicos como los que describen la acumulación tanto de sustancias tóxicas, como metales pesados en las plantas (Taladrid y Espinosa 2021, Bellani *et al.* 2016, Sun *et al.* 2020). De ahí que esta especie se emplee frecuentemente para advertir la presencia de sustancias fitotóxicas mediante los efectos negativos que estas provocan sobre la germinación de las semillas y su crecimiento y de esta forma, extrapolar datos respecto de una especie vegetal en estudio y también establecer comparaciones con otras especies sometidas al mismo tipo de sustancias o elementos fitotóxicos, tal como se acredita en trabajos previos (Araniti *et al.* 2013, Wang *et al.* 2001, Matoušková *et al.* 2019, Migliore *et al.* 2003).

Para llevar a cabo esta determinación, se utilizaron placas Petri de 10 cm de diámetro, cubiertas con papel de filtro, en el mismo se colocaron 10 semillas de rabanito y se añadieron 2 mL de diluciones de los consorcios con una absorbancia de 0,6 DO a 600 nm. Por consorcio se realizaron dos tratamientos, en uno de ellos las diluciones serán en solución fisiológica y en el otro en medio de cultivo líquido. Estos tratamientos se contrastaron con tres diferentes testigos, los cuales estaban contenidos en dos medios líquidos diferentes (agua y solución fisiológica). Las placas se incubaron en estufa a 28 °C, en condiciones óptimas de humedad 100 % (cama húmeda) y oscuridad por 48 h. Transcurrido este tiempo, se agregó 1 mL de solución de etanol/agua 1:1 (v/v) para detener el crecimiento de las plantas. Se cuantificó el número de semillas germinadas y la longitud alcanzada por las raíces, por placa. Los resultados se expresaron como índice de germinación, el cual se obtendrá a partir de la siguiente ecuación:

$$IG \% = (((SG \times 100) / TSG) \times (LR \times 100 / LRA)) / 100$$

IG % = Índice de germinación

GS= Semillas germinadas

TSG= Total de semillas germinadas

LR= Largo de raíz promedio

LRA= Largo de raíz en el agua (tratamiento control)

Finalmente, se estableció el nivel de fitopatogenicidad tal como se muestra en la tabla 1, en función del valor obtenido en la ecuación (Bagur-González et al., 2011).

Tabla 1. Nivel de fitopatogenicidad

Índice de Germinación	Nivel de Toxicidad
$IG \leq 50$	Presencia de sustancias tóxicas
$50 < IG < 80$	Presencia de sustancias tóxicas moderadas
$IG \geq 80$	Ausencia de sustancias tóxicas

4.2.3 Evaluación de la fitotoxicidad del soporte suplementado con alperujo fresco y fermentado

Se evaluó la toxicidad en diferentes extractos acuosos, obtenidos a partir de soportes compuestos por sustrato inerte suplementado con diferentes concentraciones de alperujo de oliva, tal como se detalla en la tabla 2.

Tabla 2: Muestras de sustrato inerte suplementado con diferentes concentraciones de alperujo

Soporte	AL fresco (% p/p)	Sustrato inerte (% p/p)
1	5%	95%
2	15 %	85%
3	25%	75%

El extracto líquido se preparó en una relación 1/10 (g soporte/ml de solvente), agitando por 30 min, con posterior centrifugación por 10 minutos a 5000 rpm, y filtrando el sobrenadante. Luego se siguió la metodología de 4.2.2 reemplazando la solución de consorcio bacteriano por el extracto acuoso.

4.3 Pruebas en condiciones controladas de invernadero

4.3.1 Evaluación de parámetros de emergencia de brotes y establecimiento de la plántula de tomate.

Las diferentes muestras estaban constituidas por mezclas compuestas por sustratos inertes, diferentes concentraciones de alperujo (Al) e inóculo bacteriano del género *Azoapirillum sp.*. Se realizaron seis réplicas por cada tratamiento y controles. Los tratamientos presentaron las siguientes composiciones: (alperujo 5% + Consorcio), (alperujo 15% + Consorcio); (alperujo 5% sin inoculación de consorcio bacteriano); (alperujo 15% sin inoculación de consorcio bacteriano); (Tratamiento sólo con inóculo de consorcio bacteriano); (Tratamiento control, sólo con sustrato inerte).

Para la siembra se regaron los plantines a capacidad de campo, luego se inocularon con 1ml de solución de 0.6 DO a 600nm con los diferentes consorcios bacterianos seleccionados.

Para el ensayo en condiciones de invernadero de germinación y establecimiento de plántulas de tomate, se utilizaron 7 bandejas de 6 alvéolos (tratamientos y controles). Se sembraron con dos semillas de tomate por cada alvéolo. Luego se regaron hasta capacidad de campo. Para los tratamientos el sustrato de soporte inerte y alperujo se incubaron con consorcios bacterianos en concentración de 0,6 DO (absorbancia) a 600 nm de longitud de onda. Se utilizaron como inóculo de los tratamientos los consorcios seleccionados en los items anteriores de este trabajo, los cuales cuenta con capacidades PGPB, no fitopatógenas y tolerantes a distintas concentraciones de alperujo. Se realizó un control en el cual no se aplicó ningún tipo de fertilización. A partir de la primera emergencia de la plántula, los plantines de tomate se mantuvieron en condiciones de invernadero: temperatura mínima de 7 °C y máxima 37 °C, humedad de rocío y buena penetración de luz. Estas condiciones se simularon en una carpa de cultivos de interior (*indoor*) de 1mx1mx1.80m (Bellavita Cultivos), con una luz ultra espectro de la marca Growtech, la cual estaba programada para tener ciclos de 12h luz (400 W). El cultivo se regó todos los días manualmente con un pulverizador, sin llegar a la capacidad de campo de los almácigos para no lavar el inóculo bacteriano ni el alperujo.

Las variables a evaluar fueron: longitud del tallo (cm), peso seco de tallo y hojas (g), peso seco de la raíz (g), área total de hojas verdaderas (cm²). Los registros se tomaron a los 30 días de la siembra. Las mediciones se realizaron con un calibre digital Stronger.

4.4 Monitoreo de las comunidades microbianas.

Se realizó el recuento de las comunidades microbianas de hongos, levaduras y bacterias (específicamente del género *Azospirillum*) del sustrato de los mastines en los que se desarrollaron los plantines de tomate anteriormente, después de realizar la extracción y medición de las variables vegetativas de los mismos. Se determinó el número de microorganismos por recuento de UFC en placa utilizando:

- ✓ Medio de cultivo para bacterias del género *Azospirillum sp.* (para 1000 ml).

Ácido Málico (5 g); K₂HPO₄ (0,5 g); MgSO₄ 7H₂O (0,2 g); NaCl (0,1 g); CaCl₂ 2H₂O (0,02 g); Fe EDTA sol 1,64 % (4mL); azul de Bromotimol (2mL); solución de vitaminas (1

ml); solución basal (2ml); agar (1,75 g); agua destilada suficiente para enraizar a 1000 mL.

Solución de vitaminas: Biotin 0,01 %; Pyridoxol-HCl (Vit 6) 0,02 %.

Solución basal: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,04 %; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,012 %; H_2BO_4 0,14 %; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 %; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,15 % (Kassemy Nannipieri, 1995). M. Bacterias (*Azospirillum sp.*); hongos y levaduras. (Alef & Nannipieri, 1995).

✓ Medio de cultivo para hongos (para 1000 ml).

Agar CZAPEK cloranfenicol 0.1 g/L: NaNO_3 3g/L, K_2HPO_4 1g/L, MgSO_4 0.5g/L, KCL 0.5g/L, FeSO_4 0.01g/L, sacarosa 30 g/L y agar 15 g/L, se ajustó a pH 5.5 (Alef & Nannipieri, 1995).

✓ Medio de cultivo para levaduras (para 1000 ml).

Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) cloranfenicol 0,1g/L: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa/dextrosa 20 g/L, agar 15 g/L, a pH 4,5. L. (Alef & Nannipieri, 1995).

Se analizaron los tres grupos mencionados, en función de evaluar el establecimiento, comparando el recuento de UFC de los tres grupos entre los tratamientos y dentro de cada uno de ellos. Se evaluó el predominio del género bacteriano inoculado, dado que los sustratos en los que se realizaron los ensayos no eran estériles, por lo que podrían contener carga microbiana previa (Qiu *et al.* 2019, Sipahutar *et al.* 2018, Kong *et al.* 2019).

4.5 Análisis estadísticos

El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante un Análisis de la Varianza no paramétrico (ANOVA). La separación de medias a posteriori, se realizó por método de Tukey con un nivel de significancia menor a 0,05. Para los resultados que no presenten una distribución normal se realizará la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Los parámetros de crecimiento y recuento microbiano se relacionaron usando Análisis Estadístico Multivariado de Componentes Principales (ACP) para determinar

qué variables se asocian con los diferentes testigos y tratamientos. Estos análisis se hicieron utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2018.

5. Resultados

Se realizó una prueba de normalidad tanto a los resultados del análisis de toxicidad-fitopatogenicidad como a los resultados de las pruebas *in vivo* sobre plántulas de tomates y todos ellos no mostraron una distribución normal. Por ende, todos los análisis de varianza que se realizaron fueron no paramétricos a través de la prueba de Kruskal Wallis.

5.1 Tolerancia de consorcios bacterianos al alperujo

En función a los resultados de la tabla N° 3 se determinaron los consorcios bacterianos del género *Azospirillum* sp. B1, B3 y B4 como los más tolerantes al alperujo en concentraciones crecientes, candidatos para su utilización en los ensayos *in vivo* con plantines de tomate.

Tabla 3: Representación de *screening* de los consorcios bacterianos en función de su tolerancia creciente a diferentes concentraciones de alperujo, cuantificada en función de la biomasa desarrollada. El símbolo + significa mayor desarrollo de biomasa bacteriana.

Consorcio	Al 5%	Al15	Al 25
B1	++++	++++	++++
B2	+++	++	++
B3	++++	++++	++++
B4	++++	+++	++
B5	++++	++	-
B6	+++	+++	++

5.2 Fitopatogenicidad bacteriana *in vitro*

En la evaluación de fitopatogenicidad *in vitro* a partir del uso de semillas sensibles, se registraron los valores más altos de IG, que corresponden a los consorcios bacterianos B1 y B3, los cuales se encuentran dentro de los límites de no patogenicidad (ver tabla 1), comparados con los resultados presentados en tabla 4.

En función de estos resultados, se seleccionaron los dos consorcios bacterianos que presentaron los valores significativos más elevados de IG según la tabla 1, para realizar pruebas *in vivo* en platines de tomate.

Si bien B4 presentó buenos valores de IG, no presentó buenos valores de producción de biomasa respecto de los demás aislamientos (tabla 3). Debido a esto, este consorcio no fue seleccionado para utilizarlo en el ensayo *in vivo* con plantines de tomate.

B2, B5 y B6, mostraron algún grado de fitopatogenicidad, por ende, no se los incluyo en los análisis *in vivo* en plántulas de tomate.

Tabla 4: Análisis de fitopatogenicidad de distintas concentraciones de alperujo. Análisis de la varianza de medias de IG para semillas de rabanito. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$ Kruskal Wallis). Se indica media \pm la Desviaciones estándar por cada tratamiento.

Consorcio	Media de IG
B1	92,27 \pm 9,65 D
B2	51,41 \pm 11,07 B
B3	99,89 \pm 10,45 D
B4	76,98 \pm 4,73 CD
B5	30,94 \pm 0 A
B6	54,32 \pm 8,67 BC

5.3 Fitotoxicidad del alperujo *in vitro* en base al índice de germinación (IG)

Para la evaluación de tolerancia a concentraciones crecientes de alperujo (5, 15 y 25%), se analizaron los valores de IG de semillas sensibles, indicados en la Tabla 1 correspondiente al apartado materiales y métodos. Se determinó que los valores de IG más bajos (más tóxico) significativos sobre semillas sensibles, se registraron en las muestras con concentraciones de alperujo a 25%.

En función de estos resultados se optó, para realizar las demás pruebas en vivo, las muestras con concentraciones de 5 y 15% de alperujo.

En lo que respecta a las muestras con concentraciones del 5% y 15% (p/p), denotan una toxicidad moderada, con un IG promedio mayor 50, como se indica en la tabla 1 de materiales y métodos. Además, en el análisis de varianza, ambos tratamientos no muestran diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

Tabla 5: Análisis de fitotoxicidad de distintas concentraciones de alperujo.

Análisis de la varianza de medias de IG para semillas de rabanito.

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$ Kruskal Wallis). Se indica media \pm la Desviaciones estándar por cada tratamiento. Al: alperujo

Tratamiento	Media de IG
Al 5%	59,25 \pm 0,56 B
Al15%	51,4 \pm 5,23 B
Al25%	1,06 \pm 0,28 A

5.4 Ensayos *in vivo* en plantas de tomate

5.4.1 Datos vegetativos

5.4.1.1 Altura del tallo

Para la variable vegetativa altura del tallo, se pueden observar diferencias entre las distintas muestras con variaciones, no significativas entre la mayoría de los tratamientos (gráfico 1). El tratamiento inoculado con el consorcio Bacteriano 1 (B1) fue el que mostró el valor promedio más alto de esta variable (3.91cm), sin embargo, el

análisis de varianza no mostró diferencias significativas con los tratamientos C, B3, AI5%B1, AI5%, AI5%B3, AI15%B3 y AI15%B1 ($p \geq 0.05$). Sí mostró diferencia significativa con el tratamiento AI15% ($p \leq 0.05$), el cual evidenció la altura de tallo promedio más baja de todos los tratamientos (3.03cm).

Si bien el tratamiento AI15%, manifestó el valor de altura del tallo más bajo, no se encontraron diferencias significativas con los tratamientos B3, AI5%B1, AI5%, AI5%B3, AI15%B3 y AI15%B1 ($p \geq 0.05$).

Los resultados también mostraron diferencia significativa entre el tratamiento control y AI15% ($p \leq 0.05$).

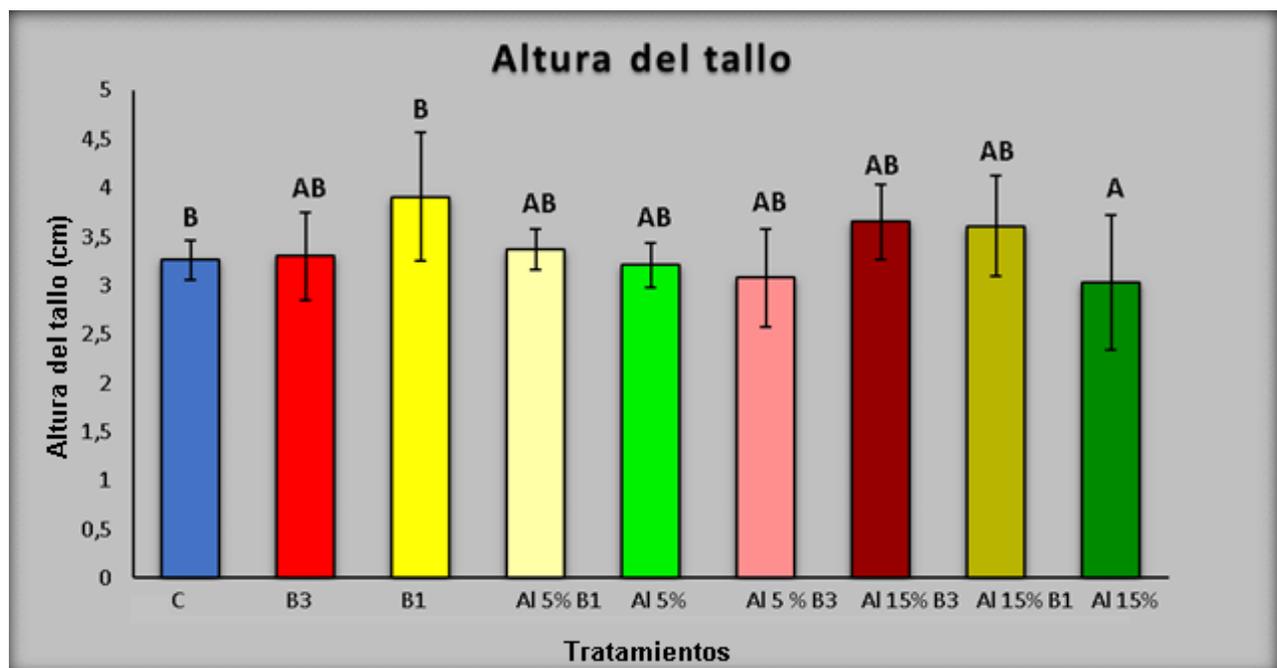


Gráfico 1: Comparación de medias por Análisis de la varianza para la variable altura del tallo de plántulas de tomate entre distintos tratamientos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$ KW). En el eje X, pueden observarse los distintos tratamientos abreviados: C (control), B3 (consorcio bacteriano de *Azospirillum* B3), B1 (consorcio bacteriano de *Azospirillum* B1), AI5%B1 (alperujo al 5% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B1), AI5% (alperujo al 5 %), AI5%B3 (alperujo al 5% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B3), AI5%B3 (alperujo al 15% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B3), AI5%B1 (alperujo al 15% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B1), AI15% (alperujo al 15 %).

5.4.1.2 Área total de las hojas verdaderas

Los resultados del área de la hoja verdadera se muestran en el gráfico 2. El tratamiento con mayor área foliar fue B1 (0.56 cm^2), diferenciándose significativamente del control y del resto de los tratamientos.

Sólo los tratamientos A15% y A15%B1 (0.3 cm^2 y 0.17 cm^2 respectivamente) mostraron diferencias significativamente menores que A15%B3 (0.46 cm^2). Sin embargo, ninguno de estos tres tratamientos, mostró diferencia significativa con el resto de los tratamientos y el control.

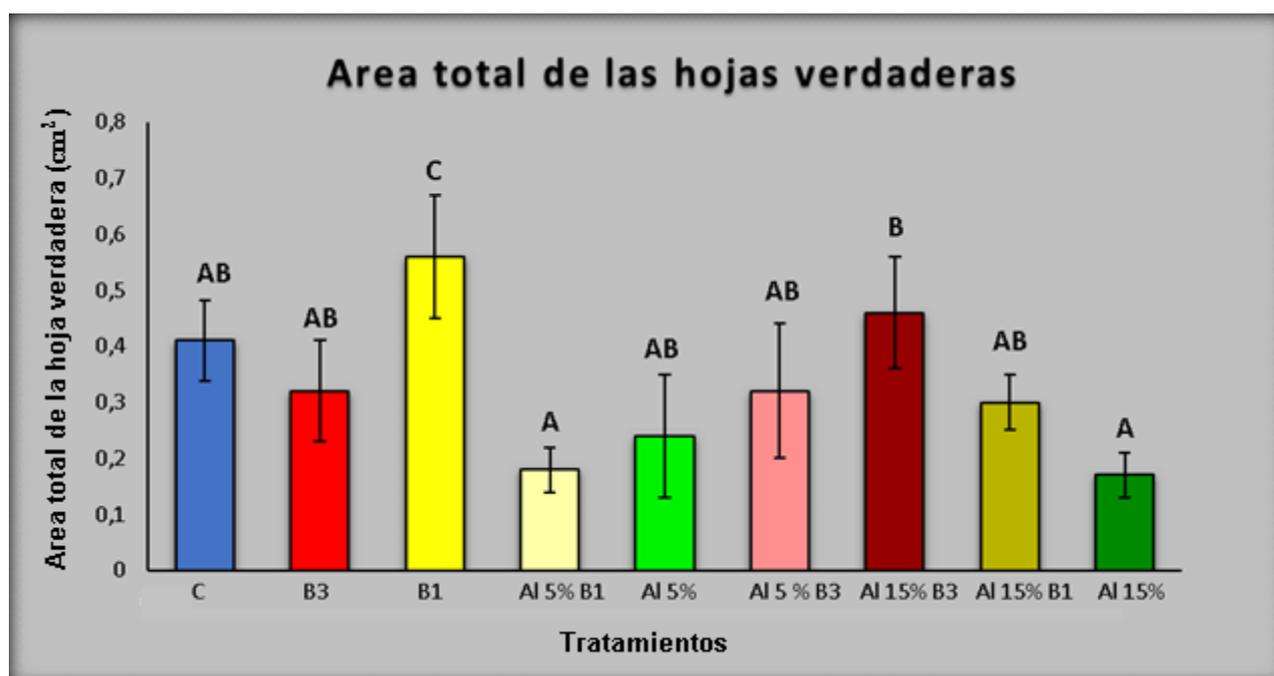


Gráfico 2: Comparación de medias en la variable área total de hojas verdaderas de plántulas de tomate entre distintos tratamientos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). En el eje X, pueden observarse los distintos tratamientos abreviados: C (control), B3 (consorcio bacteriano de *Azospirillum* B3), B1 (consorcio bacteriano de *Azospirillum* B1), A15%B1 (alperujo al 5% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B1), A15% (alperujo al 5%), A15%B3 (alperujo al 5% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B3), A15%B3 (alperujo al 15% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B3), A15%B1 (alperujo al 15% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B1), A15% (alperujo al 15%).

5.4.1.3 Peso seco de tallo y hojas

Los resultados del peso seco de tallo y hojas se muestran en el gráfico 3. B1 y B3 son los tratamientos que mostraron los valores más elevados (0.011 g y 0.009 g respectivamente) en relación a los demás. Se observa que B1 no mostró diferencias significativas con B3, pero sí con todos los otros tratamientos aplicados.

Por otra parte, al analizar B3, se observa que sólo mostró diferencias significativas con los tratamientos en los que se aplicó alperujo sin ningún tipo de inóculo bacteriano (AI5% y AI15%).

Finalmente, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos C (control), AI5%B1, AI5%B3, AI15%B3, AI15%B1 (tratamientos con alperujo en alguna proporción e inóculo) y los tratamientos AI5% y AI15% (con alperujo sin inóculo).



Gráfico 3: Comparación de medias en la variable peso seco de tallo y hojas de plántulas de tomate entre distintos tratamientos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). En el eje X, pueden observarse los distintos tratamientos abreviados: C (control), B3 (consorcio bacteriano de *Azospirillum* B3), B1 (consorcio bacteriano de *Azospirillum* B1), AI5%B1 (alperujo al 5% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B1), AI5% (alperujo al 5 %), AI5%B3 (alperujo al 5% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B3), AI5%B3 (alperujo al 15% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B3), AI15%B3 (alperujo al 15% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B3), AI15%B1 (alperujo al 15% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B1), AI15% (alperujo al 15 %).

5.1.4.4 Peso seco de la raíz

Los resultados de la variable peso seco de la raíz se muestran en el gráfico 4. Puede observarse que el análisis de varianza no muestra diferencias significativas entre los tratamientos B3, B1, AI5%B1, AI5%, AI5%B3 y el control.

A su vez, sí se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos nombrados anteriormente y AI15%B1, AI15%B3 y AI15%, a excepción AI5%B1, que no muestra una similitud estadística con el tratamiento AI15%B3.

Todos los tratamientos con alperujo en una proporción del 15%, con y sin bacteria, manifestaron los valores medios más bajos de peso seco de la raíz (menores a 0.0051g) y no presentaron diferencias significativas entre ellos.

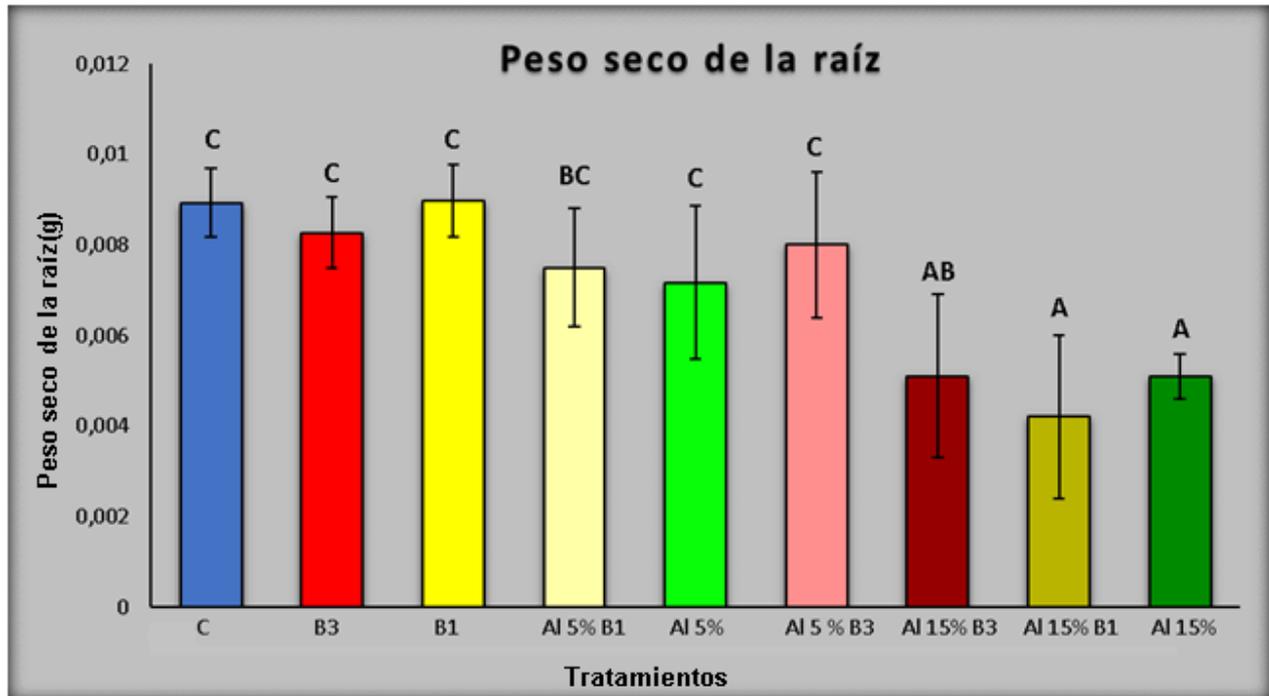


Gráfico 4: Comparación de medias en la variable peso seco de la raíz de plántulas de tomate entre distintos tratamientos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). En el eje X, pueden observarse los distintos tratamientos abreviados: C (control), B3 (consorcio bacteriano de *Azospirillum* B3), B1 (consorcio bacteriano de *Azospirillum* B1), AI5%B1 (alperujo al 5% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B1), AI5% (alperujo al 5%), AI5%B3 (alperujo al 5% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B3), AI5%B3 (alperujo al 15% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B3), AI5%B1 (alperujo al 15% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B1), AI15% (alperujo al 15%).

5.5 Recuentos microbianos

Los resultados del recuento microbiano se encuentran expresados en la tabla 6.

En el recuento de UFC de hongos filamentosos para las diferentes muestras estudiadas se encontraron diferencias significativas entre ellas (tabla 6), $p < 0.001$.

Las muestras que presentaron los valores significativamente más elevados en el recuento de esta variable fueron AI15%B1, AI15%B3, AI5% y AI5%B1. Similares a estos valores fueron los tratamientos con AI15% y AI5%B3, pero éste último tuvo diferencia significativa con los tratamientos con los valores más elevados de esta variable.

Por otro lado, el tratamiento control y ambos tratamientos sólo con B1 y B3, presentaron los valores significativamente menores de recuento UFC de hongos filamentosos, los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí, pero sí lo hicieron con el resto de los tratamientos.

Existe diferencia significativa con respecto al número de UFC de levaduras entre los distintos tratamientos ($p < 0.001$).

Los resultados mostraron que A15% y A15%B1, fueron los tratamientos que tuvieron significativamente mayor número de UFC de levaduras en comparación con los tratamientos control, B3, A15%B1, A15%B3 y A15%B3 a excepción de los tratamientos B1 y A15%, con los cuales mostró una similitud estadística.

El número de UFC del tratamiento A15%, tuvo diferencias significativas con los tratamientos control, B3, A15%B3 y A15%B3, pero no fue significativamente diferente con el tratamiento A15%B1.

Los tratamientos aplicados fueron significativos ($p < 0.001$) para el recuento de UFC de *Azospirillum sp.*

Por un lado, los tratamientos que dieron significativamente mayor, fueron aquellos tratados con la combinación de alperujo y consorcios bacterianos (A15%B1, A15%B3, A15%B3 y A15%B1) y además también del tratamiento solo con B3. (tabla 6)

Los tratamientos con menor número de UFC de *Azospirillum sp.*, en los que no se encontró diferencia significativa, fueron el tratamiento control, los tratamientos con alperujo sin inocular (A15% y A15%) y el tratamiento solo con B1.

El análisis del número de UFC de los distintos grupos microbianos, dentro de cada tratamiento, pueden verse en la tabla 6.

Dentro de los tratamientos A15%B1, A15%B3, A15%B3, A15%B1, B3 y el control, el recuento de UFC, mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) entre hongos, levaduras y *Azospirillum sp.* En este último, el valor de UFC fue significativamente mayor, respecto a los demás grupos microbianos.

En las muestras solo tratadas con AI5% y AI 15%, los valores de UFC de hongos y *Azospirillum* sp., no mostraron diferencias significativas entre ellos, pero sí con el número de UFC de levaduras.

Para el tratamiento en el que sólo se inoculó B1, los valores que mostraron diferencias significativas entre ellos fueron el número de UFC de levaduras y *Azospirillum* sp., mientras que los hongos tuvieron valores de UFC estadísticamente similares a ambos grupos.

Tabla 6: Comparación de medias de N° de UFC de hongos levaduras y *Azospirillum* sp.. Letras Mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$ Kruskal Wallis). Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores numéricos de UFC de los distintos microorganismos dentro de cada tratamiento ($p \leq 0.05$ Kruskal Wallis). Se indica las medias \pm las desviaciones estándar de cada variable por cada tratamiento.

Tratamiento	UFC de Hongos Medias \pm DE	UFC de Levaduras Medias \pm DE	de UFC de <i>Azospirillum</i> sp. Medias \pm DE
C	3,41 \pm 0,21 Ab	0,95 \pm 1,47 ABa	5,38 \pm 0,6 Ac
B3	2,96 \pm 0,4 Ab	0 \pm 0 Aa	6,86 \pm 0,25 Bc
B1	3,46 \pm 0,14 Aab	2,48 \pm 1,92 BCDa	5,47 \pm 1,09 Ab
AI 5% B1	4,73 \pm 0,29 Bcb	3,35 \pm 2,1 ABCa	6,84 \pm 0,31 Bc
AI 5%	4,8 \pm 0,19 Bcb	3,38 \pm 0,23 CDa	4,73 \pm 0,45 Ab
AI 5 % B3	3,86 \pm 0,09 ABb	1.08 \pm 1,67 ABa	6,9 \pm 0,04 Bc
AI 15% B3	4,95 \pm 0,36 Cb	0 \pm 0 Aa	6,85 \pm 0,1 Bc
AI 15% B1	4,99 \pm 0,05 Cb	3,74 \pm 0,11 Da	7,03 \pm 0,03 Bc
AI 15%	4,67 \pm 0,12 BC b	3,65 \pm 0,32 Da	5,01 \pm 0,28 Ab

5.6 Interacción entre las diferentes variables analizadas y los tratamientos

En el Gráfico 5, se realiza el análisis multivariado de componentes principales; se pueden observar diferentes relaciones entre los tratamientos y las variables.

Para este análisis se utilizaron los datos de las variables biológicas registradas en los plantines y microbiológicas registradas en el sustrato de los plantines.

Los tratamientos B1 y B3, son los que presentaron mayor asociación positiva con variables vegetativas como: peso seco de tallo y hoja, área total de hoja verdadera y altura del tallo, mientras que el control se asocia estrechamente al peso seco de la raíz. Por otra parte, se puede enunciar que las variables microbiológicas como, UFC hongos, UFC levaduras y UFC de *Azospirillum* sp. se asociaron a las muestras que contenían alperujo.

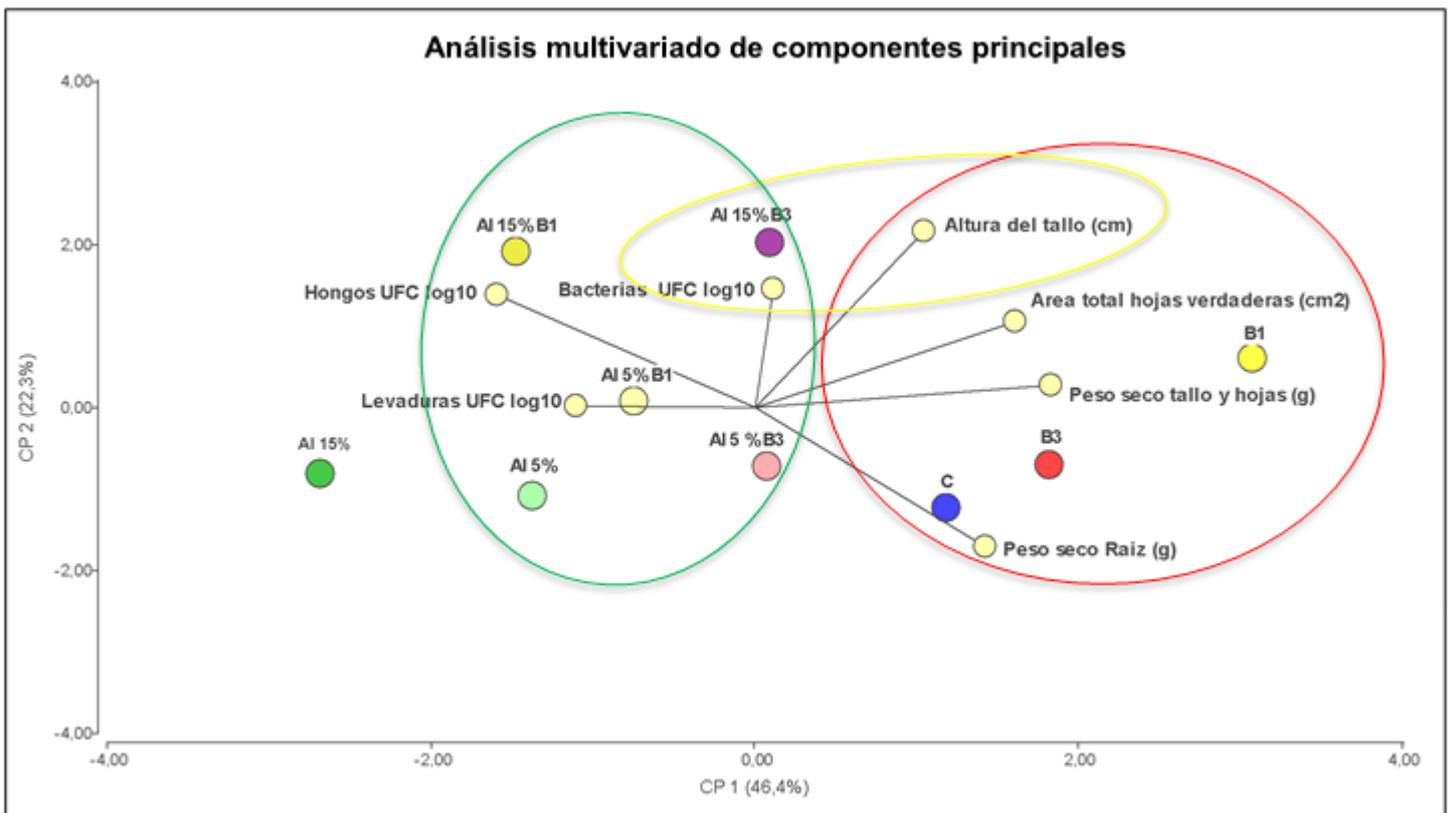


Gráfico 5: Análisis multivariado de componentes principales, entre los diferentes tratamientos (AI5%, AI15%, B1, B3, AI5%B1, AI5%B3, AI15%B1, AI15%B3), control, las variables vegetativas plantines de tomate: altura del tallo, área total de hojas verdaderas, peso seco de tallo y hojas, peso seco raíz y variables microbiológicas: NºUFC de hongos (Hongos UFC log10), Nº UFC de levaduras (Levaduras UFC log10), Nº UFC de *Azospirillum* sp.(Bacterias UFC log10). Pueden observarse los distintos tratamientos abreviados: C (control), B3 (consorcio bacteriano de *Azospirillum* B3), B1 (consorcio bacteriano de *Azospirillum* B1), AI5%B1 (alperujo al 5% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B1), AI5% (alperujo al 5%), AI5%B3 (alperujo al 5% + inóculo de

consorcio *Azospirillum* sp. B3), A15%B3 (alperujo al 15% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B3), A15%B1 (alperujo al 15% + inóculo de consorcio *Azospirillum* sp. B1), A15% (alperujo al 15 %).

6. Discusión

6.1 Evaluación de fitotoxicidad y fitopatogenicidad en *Raphanus sativus* (rabanito)

La fitotoxicidad es una medida del retraso o la inhibición de la germinación de semillas, la inhibición del crecimiento de las plantas o cualquier efecto adverso sobre las plantas causado por sustancias específicas (Camacho *et al.*, 2019). Así, los bioensayos de fitotoxicidad pueden detectar cualquier sustancia capaz de generar estrés temporal o a largo plazo sobre la capacidad de germinación de las semillas (Pavel *et al.*, 2013). La evaluación de la fitotoxicidad es necesaria antes del desarrollo de un biofertilizante (Kantha *et al.*, 2015). Esta técnica es ampliamente utilizada debido a la fidelidad de los resultados en cortos períodos de tiempo y a la posibilidad de extrapolación de los mismos a otras especies (Solórzano, 2014). En nuestro ensayo el consorcio bacteriano B5 (aplicado en la concentración más alta) produjo efecto tóxico en rabanito, probablemente debido a la producción de sustancias fitotóxicas que en algunos casos son producidas por consorcios microbianos y que podrían relacionarse con el biocontrol (Vishwakarma *et al.*, 2020). Estos resultados son similares a los registrados por Pastor-Bueis (2017) donde utilizaron una cepa de *Bacillus siamensis* aislada de la rizósfera de pimiento (*Capsicum annuum*) con el fin de formular un biofertilizante. Utilizaron diferentes tipos de semillas sensibles como rabanito, lechuga, tomate entre otras, para evaluar la fitopatogenicidad. La aplicación de esta cepa en diluciones del 10 y 20% no presentó efectos secundarios compatibles con fitopatogenicidad bacteriana, a diferencia de nuestros consorcios, donde uno sí mostró un efecto fitopatógeno (consorcio B5).

Los resultados que brindó el análisis de toxicidad del alperujo, frente al índice de germinación de semillas de rabanito, nos mostraron que cuando se utiliza una dilución al 25% de alperujo, éste presenta elevada toxicidad, registrando índices de germinación por debajo de 1,06. Esto coincide con Proieti *et al.* (2015), que indicaron efectos tóxicos del alperujo en la germinación de semillas de rabanito, al evaluar extractos concentrados de alperujo al 25%. Mientras que, en nuestros resultados, para los tratamientos con dosis más bajas, 5% y 15%, la toxicidad fue moderada, siendo éstas las seleccionadas para los ensayos siguientes. Estos resultados coinciden con L. Rodríguez (2019), que

obtuvo resultados similares para dosis de 6% y 11%, con un índice de germinación de 100% en alperujo sin ningún tipo de tratamiento.

6.2 Variables medidas en tomate

6.2.1 Peso seco

La determinación del peso seco es una medida precisa para evaluar el crecimiento de plantas, debido a que el peso fresco es menos preciso porque se ve afectado por numerosos parámetros ambientales y técnicos, incluso la humedad relativa, temperatura de laboratorio y las corrientes de aire durante la exposición de partes de la planta separadas de la misma antes de pesar cada muestra (Bashan & de-Bashan, 2005; Patil *et al.*, 2011; Ramírez & Kloepper, 2010). El crecimiento de la raíz es uno de los principales marcadores a través del cual se mide el efecto benéfico de las bacterias PGPB (Mendoza, 2015). En nuestros resultados no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos control, B1, B3, A15%B1, A15%, A15%B3 (gráfico 3). Dado que nuestro experimento duró 30 días, en estadios muy jóvenes de los platines de tomate, nuestros resultados no expresaron un cambio en el peso de la raíz por parte de los tratamientos inoculados con B1 y B3, con respecto al control, se estima que los efectos de las bacterias PGPB, sobre esta variable pueden llegar a mostrarse en un tiempo posterior al que se tomaron las medidas o en estadios fenológicos más avanzados. Widnyana & Javandira (2016) coinciden con los resultados mencionados, demostrando que los efectos de los inoculantes (*Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.*) utilizados para la promoción en la germinación y el crecimiento de las plántulas de tomate fueron observados a los 28 días desde el comienzo de los tratamientos. Luna Martínez (2013) determinó en plántulas de tomate, que a los 30 días de haber inoculado con cuatro cepas de *Bacillus*, mostró diferencias significativas con respecto al control. Si bien estos autores tuvieron resultados en el tiempo de duración de nuestro ensayo, cabe destacar la diferencia de género de los microorganismos utilizados y las distintas condiciones en las que se realizaron esos estudios (condiciones reguladas de invernadero y exterior). Ribaudó *et al.* (2006), informó la interacción positiva de la semilla de tomate y una cepa de *Azospirillum Brasilens*, en el peso seco de la raíz, reportando un aumento en la formación de pelos radiculares, después de un tiempo de la eclosión de la semilla. Dicho ensayo, estos autores, lo realizaron *in vitro*, dándose esta

interacción más evidente y en estados vegetativos de planta de tomate más avanzados que los evaluados en nuestros ensayos.

En lo que respecta a los tratamientos que combinaron AI 5% con los distintos consorcios bacterianos y el tratamiento sólo con AI 5%, no mostraron diferencias significativas en el peso seco de la raíz con respecto al control. Esto se explica debido a que, a bajas concentraciones, este residuo no causa efectos tóxicos para los cultivos (Paroldi, 2015). A diferencia de los tratamientos con una dosis de alperujo más alta, AI15%, donde sí se pudo observarse el efecto fitotóxico de la enmienda. Esto puede deberse a la presencia de compuestos fenólicos característicos del alperujo (Rodríguez, 2019), los cuales se encuentran en mayor proporción dado la concentración de la enmienda en comparación con otros tratamientos.

Los inóculos de *Azospirillum sp.* a bajas concentraciones de alperujo no tuvieron diferencias significativas con respecto al tratamiento control. Esto no nos muestra un incremento en estas variables vegetativas al tratarlos con esta enmienda, pero podemos observar que no tiene efectos negativos sobre la misma a concentraciones del 5%. Dada la similitud con aquellos tratamientos no inoculados con consorcios bacterianos PGPB, estos valores podrían cambiar en estadios posteriores de la planta de tomate debido a lo expuesto en párrafos previos.

Descartamos un efecto tóxico de la enmienda sobre el inóculo ya que, en los tratamientos con alperujo al 15% y 5%, combinados con cualquiera de los inóculos de *Azospirillum sp.* utilizados, los microorganismos con un número de UFC significativamente más grande fueron las bacterias contadas en el medio específico para *Azospirillum sp.*.

Según lo expresado en los resultados con respecto al peso seco del tallo y hojas, sobre todo para el consorcio bacteriano B1, concuerdan con lo que se observa en Almaghrabi *et al.* (2013), donde las plantas de tomate inoculadas con bacterias PGPB del género *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* y *Serratia sp.*, tuvieron un peso seco de brotes y plántulas más alto significativamente que el del tratamiento control. Para el consorcio bacteriano B3, si bien puede observarse un aumento en el peso seco del tallo y hojas, al no ser estadísticamente significativa la diferencia con el tratamiento control, puede que

el efecto PGPB de este consorcio se muestre en un tiempo posterior, como lo que sucede con el peso seco de la raíz.

Por otro lado, los tratamientos que contenían un porcentaje de alperujo, no mostraron diferencias significativas con el tratamiento control (gráfico 3), lo que demuestra que, para esta variable, nuestros consorcios de *Azospirillum sp.* expresan mejor su característica PGPB estando en un sustrato sin alperujo, que en los sustratos con alperujo. Además, estos resultados demuestran que esta enmienda aplicada en concentración de 5% y 15%, no afecta al peso seco del tallo y hojas en este estadio de la plántula de tomate.

6.2.2 Altura del tallo

Si bien no se encontraron diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos, puede observarse que el control y B1, posee los valores medios más altos. Sin embargo, esto no tiene relevancia en la interpretación de nuestros datos ya que el análisis de varianza revela que estos resultados coinciden con el tratamiento control. Esto podría explicarse con los datos de Widnyana & Javandira (2016), quienes afirman que a los 28 días de inoculado de la semilla con bacterias PGPB, no se expresan características vegetativas en la plántula de tomate dadas por estas bacterias PGPB. Al ser de 30 días la duración de nuestro ensayo, puede que la elongación del tallo causada por los consorcios bacterianos de *Azospirillum sp.*, no fuese expresada hasta un tiempo posterior a la finalización del estudio.

Una característica de los resultados obtenidos a destacar es la similitud de los resultados dados en A15%, el cual no muestra diferencias significativas con el tratamiento control, a diferencia del tratamiento con alperujo al 15% (A15%), en donde las plántulas de tomate tuvieron una altura significativamente menor respecto del tratamiento control. Estos resultados coinciden con Pinho, *et al.* (2017), donde se evaluaron distintas características vegetativas de plántulas de rabanito (*Raphanus sativus*), aplicando alperujo como enmienda orgánica. Dicho estudio demostró que el tamaño de las plantas de esta especie disminuye a partir de la aplicación de este residuo como enmienda orgánica en concentraciones del 5%. La concentración de poli fenoles y taninos fitotóxicos que posee el alperujo, puede explicar esta disminución del crecimiento vegetal (Qasem, 2020).

En los tratamientos inoculados con consorcios bacterianos, se observa, que no son significativas las diferencias con el tratamiento control, independientemente de la proporción de alperujo colocado en cada tratamiento (5%, 15% o sin inocular). Estos resultados, podrían ser debido al efecto de la bacteria, si bien no se observan medias más altas, producto de sus características PGPB, los resultados reflejan una tolerancia a los efectos del alperujo en los tratamientos que contienen este residuo en alguna proporción. No se han encontrado hasta el momento en la literatura manuscritos que describan puntualmente esta relación, pero si hay evidencia de que distintos grupos microbianos tienen la capacidad de degradar polifenoles y taninos, componentes fitotóxicos de este residuo (Mutabaruka, *et al.* 2007; Schmidt, *et al.* 2013). Kupryashina (2015), demuestra la capacidad de *Azospirillum* sp. para oxidar ciertos componentes de la lignina, asumiendo la posibilidad de esta bacteria para inducir cambios destructivos en la compleja molécula polifenólica de la lignina. Esto último podría explicar la capacidad de la bacteria inoculada para disminuir la carga tóxica del soporte empleado en este ensayo.

6.2.3 Área total de las hojas verdaderas

Los mayores valores de área foliar total dependen del aporte de Nitrógeno, lo que mejora la intercepción y asimilación de CO₂ por la planta con lo que se espera un aumento en la producción de biomasa vegetal (Taiz *et al.* 2006). Aguilar-García *et al.* (2005) estudiaron que un mayor crecimiento del follaje de la planta mejora la intercepción lumínica, lo cual incrementa la fotosíntesis y por ende la producción de biomasa.

En los resultados obtenidos para la variable área total de las hojas verdaderas, para B1 sin enmienda orgánica el área fue significativamente mayor que el tratamiento control (ver gráfico 2). Este resultado puede atribuirse a la conocida capacidad de especies del género *Azospirillum* (en particular la especie *A. brasilense*) de fijar nitrógeno atmosférico (Huergo *et al.*, 2008). Dado que los consorcios empleados en este trabajo pertenecen a este género, se puede relacionar entonces este hecho con el aumento del área foliar de las plantas tratadas con B1.

Al combinar estos consorcios bacterianos con las distintas proporciones de A15% y A15%, los resultados dieron un área foliar mucho más reducida, esto puede deberse a

que el alperujo produzca un efecto inhibitor en este mecanismo que beneficia a la planta de tomate. Si bien no hay trabajos que demuestren el efecto del alperujo en la inhibición puntual del efecto fijador de nitrógeno de bacterias como *Azospirillum*, si hay evidencia de que sus componentes polifenólicos inhiben los factores virulentos de bacterias como *Pseudomonas* (Viola *et al.* 2022), lo que demuestra que este residuo sí puede tener efectos puntuales sobre ciertas actividades microbianas.

Cabe destacar, que en el tratamiento A15% (enmienda sin consorcio bacteriano), el área total de las hojas verdaderas, si bien no fue significativamente menor frente a los demás tratamientos, junto con el tratamiento de A15%B1, obtuvo los valores medios más bajos. Esto se relacionaría con el aumento de la toxicidad de la enmienda a concentraciones crecientes de alperujo (Schmidt *et al.* 2013). Por otra parte, el resultado obtenido para el tratamiento A15%B1, puede ser debido a un error experimental de alguna variable que no se haya tenido en cuenta, ya que es un valor muy dispar, comparándolo con los valores de los demás tratamientos.

6.3 Variables microbiológicas

Los cambios de carácter químico y físico tras la aplicación de enmiendas alteran la microbiota del suelo a nivel poblacional (Bastida *et al.*, 2008; Abubaker *et al.*, 2013), por ende, consideramos de suma importancia este análisis, debido a la relevancia de los microorganismos del suelo para el crecimiento vegetal.

6.3.1 Número de UFC de hongos

Los hongos filamentosos son de gran importancia en los ecosistemas, debido a que presentan enzimas extracelulares capaces de degradar compuestos recalcitrantes como polifenoles y taninos (Madigan, *et al.*, 2009).

En nuestro estudio el recuento de UFC, se realizó en cajas de Petri, revelando diferencias significativas de esta variable respecto de los diferentes tratamientos.

El mayor número de UFC de este grupo de microorganismos se cuantificaron en los tratamientos con alperujo (5% y 15%). La abundancia relativa de hongos, puede deberse a que estos microorganismos son capaces de degradar muchos de los

compuestos recalcitrantes presentes en el alperujo como, fenoles, celulosas y hemicelulosas (Dermeche *et al.*, 2013).

Al trabajar con un sustrato inerte, es de esperarse que los tratamientos que no contienen alperujo, mostraran resultados más bajos, pero algo a destacar es el tratamiento con A15%, inoculado con B3, el cual dio resultados muy similares a los tratamientos sin la aplicación de alperujo. Una posible explicación a dicho resultado es la inhibición bacteriana por parte de B3 al crecimiento de hongos presente en el alperujo, que en bajas proporciones (5%), es mucho más notoria esta interacción negativa que en proporciones mayores (15%) (Faust *et al.*, 2015; Sharifazizi, 2017).

6.3.2 Número de UFC de levaduras

Estos microorganismos son muy sensibles a diferentes perturbaciones del medio como, por ejemplo, a los cambios de pH, contenido de nutrientes, entre otros (Madigan *et al.*, 2009).

Los resultados del recuento de UFC de levaduras nos indican que los tratamientos con alperujo sin inóculo bacteriano generan un incremento en la abundancia de levaduras. También se destaca que la aplicación del consorcio bacteriano B1, no afecta de manera negativa a dicho grupo microbiano a través de una interacción negativa, como puede suceder en los tratamientos en los que se inoculó el consorcio bacteriano B3.

Esto resultados estarían indicando que la utilización de este residuo como enmienda proporciona un aumento en biomasa de levaduras, siendo esto congruente con los estudios a largo plazo realizados por Paroldi (2015), donde demuestra que la aplicación de alperujo en olivares aumenta el número de UFC de levaduras. También en Marruecos un trabajo que toma este dato tras la aplicación de alperujo como enmienda en suelos cultivados con *Mentha Spicata* (hierba buena), concluye que el incremento de levaduras se debería al aporte de estos microorganismos por parte del residuo (El Hassani *et al.*, 2010).

6.3.3 Número de UFC de *Azospirillum* sp.

El número de UFC de bacterias de nuestros resultados, aumentó en la asociación del inóculo bacteriano B3 y B1, con alperujo en distintas proporciones, siendo el que posee un valor más alto el tratamiento A15%B1 (7,03log10). Junto con estos valores, también el tratamiento sólo con el inóculo bacteriano B3, es significativamente más alto que el control, B1, A15% y A15%.

Al ser significativamente mayor el número de UFC de los tratamientos con alperujo combinado con consorcios bacterianos, indicaría la posibilidad de utilizar este residuo como enmienda orgánica y fuente de nutrientes para las bacterias inoculadas B3 y B1. Resultados similares a los anteriores fueron encontrados en un estudio, en el que se utilizó alpechín como suplemento de riego de suelos de olivares. Se reportó que incrementó la abundancia de actinomicetos y bacterias fijadoras de nitrógeno, particularmente en las capas superficiales de los suelos tratados (Di Serio *et al.*, 2008; Paroldi, 2015).

Es importante destacar que en los resultados obtenidos sobre las UFC de *Azospirillum* sp., se evidencia la característica potenciadora del número bacteriano con alperujo, ya que en los tratamientos con proporciones más grandes A15%, los valores fueron mayores comparando ambos consorcios bacterianos (B1 y B3).

6.4 Asociación entre las diferentes variables analizadas y los tratamientos

En el gráfico Bi-plot (gráfico 5), de análisis multivariado de componentes principales, se puede observar que las variables vegetativas, están asociadas principalmente a los tratamientos inoculados con bacterias, sin aplicación de alperujo. Se observó que el tratamiento B3, se encuentra asociado a los pesos secos del tallo, hojas y raíz, mientras que B1, se asocia mayoritariamente al peso seco del tallo y hojas y al área foliar de la hoja. Dicha asociación de los consorcios bacterianos a las variables vegetativas en bajas concentraciones de alperujo como enmienda orgánica, puede explicarse por la fitotoxicidad de este residuo frente al desarrollo de la planta en sus primeros estadios vegetativos (Qasem, 2020). Sin embargo, como se discutió en los ítems anteriores, puede decirse que existe una asociación positiva, en lo que respecta a la disminución del efecto tóxico del alperujo por parte de *Azospirillum* sp., en concentraciones más bajas del mismo, ya que los resultados reflejan que la enmienda en concentraciones del 5%, en combinación con los consorcios bacterianos inoculados,

se encuentran más cerca de las variables vegetativas, sobre todo los pesos secos, que cuando la enmienda fue colocada en proporciones del 15%.

En cuanto a las variables microbianas, los tratamientos que combinaban alperujo al 15% en combinación con alguno de los consorcios bacterianos, explicaron mejor el número de UFC de hongos y de bacterias que los tratamientos con alperujo al 5% combinados con los consorcios. En este caso, ambos tratamientos con proporciones menores de alperujo, se ven asociados a los valores mayores de UFC de levaduras. Cabe destacar que el grupo bacteriano fue el que presentó, en todos los casos analizados, el mayor valor significativo al comparar las medias de los diferentes grupos microbianos para todos los tratamientos. Esto indicaría la capacidad de este grupo para tolerar en las dosis evaluadas ciertos componentes tóxicos presentes en el alperujo (tabla 6). Esto coincide con los resultados enunciados en la tesis doctoral de Paroldi (2015), quien encontró un aumento en la riqueza y biomasa de la comunidad microbiana tras la aplicación de alperujo crudo en proporciones similares en suelos de olivares. En este trabajo se concluyó que la aplicación de este residuo como enmienda, beneficia a las comunidades microbianas del suelo en proporciones relativamente bajas, mejorando la calidad para su uso productivo. También los resultados de este trabajo concuerdan con los de Mekki *et al.* (2013), quien tras aplicar como riego los residuos líquidos de la producción de aceite de oliva en suelos semiáridos, observó un aumento en las UFC de microorganismos del suelo de diversos grupos.

7. Conclusiones

- Concluimos que la utilización de consorcios bacterianos del género *Azospirillum* sp. como biofertilizante de plantines de tomate, en combinación con una enmienda orgánica de alperujo de oliva fresco, es posible en proporciones 5% de este residuo ya que en proporciones de 15%, este comienza a tener algunos efectos tóxicos sobre la planta.
- El alperujo crudo utilizado como enmienda orgánica, en proporciones del 15% mostró incremento en los valores de UFC de hongos, levaduras y bacterias.
- Si bien no pudo demostrarse un aumento significativo en las variables vegetativas al combinar los consorcios bacterianos B1 y B3 con el alperujo crudo en las distintas proporciones utilizadas como enmienda orgánica en este estudio, puede

decirse que las características fitotóxicas de este residuo, que afectan a estas variables, se ven disminuidas con la combinación.

- Se evidenció que al utilizar concentraciones 15% de alperujo se ven disminuidas las características PGPB de los inóculos bacterianos que se usaron en este estudio.

8. Proyecciones

Estudios posteriores podrían evaluar la sinergia de ambos consorcios bacterianos en combinación entre sí y con proporciones de alperujo crudo similares a las evaluadas en este estudio.

Se deberían establecer ensayos en los cuales el alperujo sea parte de un preparado enriquecido para favorecer el crecimiento y la degradación de dicho residuo, en combinación con inóculos microbianos

También son necesarios estudios a mediano y largo plazo para abarcar los demás estadios fenológicos de la planta de tomate evaluando su respuesta frente a la combinación de estos tratamientos.

9. Bibliografía

- Aanderud, Z. T., Jones, S. E., Schoolmaster, D. R., Fierer, N., & Lennon, J. T. (2013). Sensitivity of soil respiration and microbial communities to altered snowfall. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 217-227.
- Abbasi, M.K. y A. Khizar. 2012. Microbial biomass carbon and nitrogen transformations in a loam soil amended with organic-inorganic N sources and their effect on growth and N-uptake in maize. *Ecol. Eng.* 39, 123-132. Doi: 10.1016/j.ecoleng.2011.12.027
- Abubaker, J., Cederlund, H., Arthurson, V. y Pell, M. (2013). Estructura de la comunidad bacteriana y actividad microbiana en diferentes suelos enmendados con residuos de biogás y purines de ganado. *Ecología del suelo aplicada* , 72 , 171-180.
- Aguilar-García, L., Escalante-Estrada, J., Fucikovsky-Zak, L., Tijerina-Chavez, L., & Engleman, E. M. (2005). Leaf area, net assimilation rate, yield and plant density in sunflower. *Terra: Órgano Científico de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo*, AC.
- Aguilar, M. J. (2009). Olive oil mill wastewater for soil nitrogen and carbon conservation. *Journal of environmental management*, 90 (8), 2845-2848.
- Altieri, M. (2009). *La agricultura moderna: impactos ecológicos y la posibilidad de una verdadera agricultura sustentable*. University of California, Berkeley, Department of Environmental Science, Policy and Management. Berkeley, CA, USA. 19 pp.
- Altieri, R., & Esposito, A. (2008). Olive orchard amended with two experimental olive mill wastes mixtures: effects on soil organic carbon, plant growth and yield. *Bioresource Technology*, 99 (17), 8390-8393.
- Andrade-Sifuentes, A., Fortis-Hernández, M., Preciado-Rangel, P., Orozco-Vidal, J. A., Yescas-Coronado, P., & Rueda-Puente, E. O. (2020). *Azospirillum brasilense* and solarized manure on the production and phytochemical quality of tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.). *Agronomy*, 10(12), 1956.
- Araniti, F., Lupini, A., Sorgonà, A., Statti, GA, & Abenavoli, MR (2013). Actividad fitotóxica de volátiles foliares y aceites esenciales de *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Investigación de productos naturales* , 27 (18), 1651-1656.
- A. Shrafuzzaman, M., Hossen, F. A., Ismael, M. R., Hoque, A., Islam, M. Z., Shahidullah, S. M., & MEON, S. (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8(7), 7-20

- Azeez, J.O. y W. Van Averbek. 2010. Nitrogen mineralization potential of three animal manures applied on a sandy clay loam soil. *Biores. Technol.* 101(14), 5645- 5651. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.119
- Bashan, Y. & De-Bashan, L.E. (2005), fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. *Soil, Biology and Biochemistry*, 37, 1795-1804
- Bastida, F., Kandeler, E., Moreno, J. L., Ros, M., García, C., & Hernández, T. (2008). Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, 40 (2), 318-329.
- Bellani, L., Giorgetti, L., Riela, S., Lazzara, G., Scialabba, A., & Massaro, M. (2016). Ecotoxicity of halloysite nanotube-supported palladium nanoparticles in *Raphanus sativus* L. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(10), 2503-2510.
- Baumgarten, A.; Spiegel, H. 2004. Phytotoxicity (Plant tolerance). Agency for Health and Food Safety, Vienna
- Cabrera, F., Madejón, E., Romero, A. S., & López, R. (2002). Diagnóstico y estudio de alpechines, orujos y alperujos. *Jornadas de investigación y transferencia de tecnología al sector oleícola*, 195-199.
- Cao, A., Guo, L., & Li, H. (2022). How does land renting-in affect chemical fertilizer use? The mediating role of land scale and land fragmentation. *Journal of Cleaner Production*, 379, 134791.
- Cassán, F.; Vanderleyden, J.; Spaepen, S. (2014). Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *J Plant Growth Regulation*, 33, 440–459
- Cid, M. I. S. (2006). Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.) (Doctoral dissertation, Universidad Austral de Chile).
- Coniglio, A.; Mora, V.; Puente, M.; Cassán, F. (2019). *Azospirillum* as Biofertilizer for Sustainable Agriculture: *Azospirillum brasilense* AZ39 as a Model of PGPR and Field Traceability. Nature Switzerland
- Consejo Federal De Investigación (CFI). (2018). Disponible en: <http://cfi.org.ar/>. Acceso en noviembre/2018
- Cuestas, G., & Mondaca, E. (2014). Efecto de un biorregulador a base de auxinas sobre el crecimiento de plantines de tomate. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 20(2), 215-222

- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48 (10), 1532-1552.
- Devi, P. I., Manjula, M., & Bhavani, R. V. (2022). Agrochemicals, Environment, and Human Health. *Annual Review of Environment and Resources*, 47.
- Dewey, F. M.; Li Wong, Y.; Serry, R.; Hollings, T. W.; Gurr, S. J. (1999). Bacteria associated with *Stagonospora* (*Septoria*) *nodorum* increase pathogenicity of the fungus. *New Phytologist*, 144, 489-497.
- Di Serio, M. G., Lanza, B., Mucciarella, M. R., Russi, F., Iannucci, E., Marfisi, P., & Madeo, A. (2008). Effects of olive mill wastewater spreading on the physico-chemical and microbiological characteristics of soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62 (4), 403-407.
- El-Beltagi, H. S., Ahmad, I., Basit, A., El-Lateef, A., Hany, M., Yasir, M., ... & Zohaib Ikram, M. (2022). Effect of *Azospirillum* and *Azotobacter* species on the performance of cherry tomato under different salinity levels. *Gesunde Pflanzen*, 74(2), 487-499.
- El Hassani, FZ, Zinedine, A., Alaoui, SM, Merzouki, M. y Benlemlih, M. (2010). Uso de aguas residuales de almazara como enmienda orgánica para *Mentha spicata* L. *Industrial Crops and Products* , 32 (3), 343-348.
- FAO. Informe olivícola 2019. Disponible en: <https://camaraolivicola.com.ar/informe-olivicola/>
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization Statistics Division, 2015. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>. Acceso en febrero/2018.
- Faust, K., Lima-Mendez, G., Lerat, JS, Sathirapongsasuti, JF, Knight, R., Huttenhower, C., ... & Raes, J. (2015). Comparación entre biomas de redes de asociación microbiana. *Fronteras en microbiología* , 6 , 1200.
- García-Jiménez P. S., Lucena J. J., Ruano S., Nogales M. S Ruano Criado Mariano Nogales García. (2008). Parte, i., & parte, i. Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. 267 pp.
- García Sánchez, M. (2013). Estrés oxidativo y otras respuestas fisiológicas inducidas por el alpeorujo transformado por hongos saprobios en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) . Universidad de Granada.
- Gheveriya, K. K., & Desai, P. B. (2014). Rhizobacteria of sugarcane: In vitro screening for their plant Growth Promoting potentials. *Research Journal of Recent Sciences*, 3, 52-58.

- Gilly, J.E. y B. Eghball. 2002. Residual effects of compost and fertilizer applications on nutrients in runoff. *Trans. Amer. Soc. Agric. Biol. Eng.* 45, 1905-1910.
- Glick, B. R. (2012). *Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications*. Scientifica, 15 pp.
- He, Z. y H. Zhang (eds.). 2014. *Applied manure and nutrient chemistry for sustainable agriculture and environment*. Springer, New York, USA. Doi: 10.1007/978-94-017-8807-6
- Huergo, L. F., Monteiro, R. A., Bonatto, A. C., Rigo, L. U., Steffens, M. B. R., Cruz, L. M., ... & Pedrosa, F. O. (2008). Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *CASSÁN, FD*; Garcia De Salomone, I. *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 17-35.
- Informes de Produccion Provincial, San Juan (IPPSJ). (2016). Disponible en: https://www.economia.gob.ar/peconomica/dnper/fichas_provinciales/San_Juan.pdf. Acceso en abril/2018.
- Jangid, K., Williams, M. A., Franzluebbers, A. J., Sanderlin, J. S., Reeves, J. H., Jenkins, M. B., ... & Whitman, W. B. (2008). Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2843-2853.
- Karpouzas, D. G., Ntougias, S., Iskidou, E., Rousidou, C., Papadopoulou, K. K., Zervakis, G. I., & Ehaliotis, C. (2010). Olive mill wastewater affects the structure of soil bacterial communities. *Applied soil ecology*, 45 (2), 101-111.
- Kavdir, Y., & Killi, D. (2008). Influence of olive oil solid waste applications on soil pH, electrical conductivity, soil nitrogen transformations, carbon content and aggregate stability. *Bioresource technology*, 99 (7), 2326-2332.
- Kong, H. G., Song, G. C., & Ryu, C. M. (2019). Inheritance of seed and rhizosphere microbial communities through plant–soil feedback and soil memory. *Environmental microbiology reports*, 11(4), 479-486.
- Koul, V. y Kochar, M. (2021). Un nuevo ARN pequeño esencial, sSp_p6, influye en la fijación de nitrógeno en *Azospirillum brasilense*. *Rizosfera* , 17 , 100281.
- Kumara, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C., & Negi, S. (2012). Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent Research in Science and Technology*, 4(1) 455-566.

- Kupryashina, M. A., Petrov, S. V., Ponomareva, E. G., & Nikitina, V. E. (2015). Ligninolytic activity of bacteria of the genera *Azospirillum* and *Niveispirillum*. *Microbiology*, 84(6), 791-795
- Lodoña-Franco, L. F., Lodoña-Muñoz, P. T., & Muñoz-García, F. G. (2016). Risk of heavy metals in human and animal health. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145-153.
- López, P. J., Montoya, R. B., Brindis, R. C., Sánchez-Monteón, M. A. L., Cruz-Crespo, E., & Morales, R. B. (2011). Estructuras utilizadas en la agricultura protegida. *Revista Fuente Año*, 3(8).
- López-Piñeiro, A., Albarrán, A., Nunes, J. R., & Barreto, C. (2008). Short and medium-term effects of two-phase olive mill waste application on olive grove production and soil properties under semiarid Mediterranean conditions. *Bioresource Technology*, 99(17), 7982-7987.
- López-Piñeiro, A., Albarrán, A., Nunes, J. R., Peña, D., & Cabrera, D. (2011). Long-term impacts of de-oiled two-phase olive mill waste on soil chemical properties, enzyme activities and productivity in an olive grove. *Soil and Tillage Research*, 114(2), 175-182.
- Luna-Guevara, M. L., & Delgado-Alvarado, A. (2014). Importancia, contribución y estabilidad de antioxidantes en frutos y productos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Avances en Investigación Agropecuaria*, 18(1).
- Luna Martínez, L., Mamríz Peniche, R. A., Hernández Iturriaga, M., Arvizu Megrano, S. M., & Pacheco Aguilera, J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(1), 63-69.
- Luo, Y.; Lian, J.; Guangming, Z.; Chen, M.; Mo, Dan.; Li, G.; Zhang, D. (2017). Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects. *Waste Management*, 71, 109-114.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. J., & Clark D. P. (2009). *Brock. Biología de los Microorganismos*, 12a. ed. Pearson Prentice-Hall.
- Mahapatra, DM, Satapatía, KC y Panda, B. (2022). Biofertilizantes y nanofertilizantes para la agricultura sustentable: Ficoperspectivas y desafíos. *Ciencia del Medio Ambiente Total* , 803 , 149990.
- Mardomingo, J.I., R.P. Soler, M.Á. Casermeiro, M.T. de la Cruz y A. Polo. 2013. Seasonal changes in microbial activity in a semiarid soil after application of a high dose of different organic amendments. *Geoderma* 206, 40-48. Doi: 10.1016/j.geoderma.2013.04.025

- Martí, L., Burba, J. N., & Cavagnaro, M. (2002). Metales pesados en fertilizantes fosfatados, nitrogenados y mixtos. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina*, 34(2), 43-48.
- Matoušková, M., Jurová, J., Grušová, D., Wajs-Bonikowska, A., Renčo, M., Sedlák, V., ... & Kalembe, D. (2019). Phytotoxic effect of invasive *Heracleum mantegazzianum* essential oil on dicot and monocot species. *Molecules*, 24(3), 425.
- Mekki, A., Dhouib, A. y Sayadi, S. (2013). Efectos de la aplicación de aguas residuales de almazara sobre las propiedades del suelo y el crecimiento de las plantas. *Revista Internacional de Reciclaje de Residuos Orgánicos en la Agricultura* , 2 (1), 1-7.
- Migliore, L., Cozzolino, S. y Fiori, M. (2003). Fitotoxicidad y absorción de enrofloxacin en plantas de cultivo. *Chemosphere* , 52 (7), 1233-1244.
- Monetta, P. M. (2017). Reutilización de residuos sólidos y semisólidos del proceso de extracción de aceite de oliva como enmienda orgánica de suelos. EEA San Juan, INTA.
- Moreno Reséndez, A., Aguilera Durón, J., & Luévano González A. (2011). Características de la agricultura protegida y su entorno en México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 15(29).
- Mutabaruka, R., Hairiah, K., & Cadisch, G. (2007). Microbial degradation of hydrolysable and condensed tannin polyphenol–protein complexes in soils from different land-use histories. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7), 1479-1492.
- Padilla-Bernal, L. E., Lara-Herrera, A., Reyes-Rivas, E. & González-Hernández, J. R. (2015). Assessing environmental management of tomato production under protected agriculture. *International Food and Agribusiness Management Review* 18, 193–211.
- Paroldi H. E. (2015). Efecto de la utilización de residuos olivícolas como enmienda orgánica sobre la calidad biológica y fisicoquímica de suelos cultivados con *Olea europea* L. en San Juan
- Pastor-Bueis, R., Mulas, R., Gómez, X., & González-Andrés, F. (2017). Innovative liquid formulation of digestates for producing a biofertilizer based on *Bacillus siamensis*: Field testing on sweet pepper. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180(6), 748-758.
- Pavel, R., Doyle, J., & Steinberger, Y. (2004). Seasonal patterns of cellulase concentration in desert soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(3), 549-554.
- Pavel, VL, Sobariu, DL, Diaconu, M., Stătescu, F. y Gavrilescu, M. (2013). Efectos de los metales pesados sobre la germinación y el crecimiento de *Lepidium sativum*. *Revista de ingeniería y gestión ambiental (EEMJ)* , 12 (4).

- Pankievicz, V.C.S.; do Amaral F.P.; Santos, K.F.D.N.; Agtuca B.; Xu, Y.; Schueller, M.J.; Arisi, A.C.; Steffens, M.B.; de Souza, E.M.; Pedrosa, F.O.; Stacey, G. (2015). Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. *The Plant Journal*, 81, 907–919.
- Parra, Y., & Cuevas, F. (2001). Revisión bibliográfica, Potenciales de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura.
- Paterson, E., R. Neilson, A.J. Midwood, S.M. Osborne, A. Sim, B. Thornton y P. Millard. 2011. Altered food web structure and C-flux pathways associated with mineralisation of organic amendments to agricultural soil. *Appl. Soil Ecol.* 48(2), 107-116. Doi: 10.1016/j.apsoil.2011.04.006
- Patil, N. B., Gajbhiye, M., Ahiwale, S. S., Gunjal, A. B., & Kspdsnins, B. P. (2011). Optimization of Indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L. isolated from Sugarcane. *International Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 295.
- Pascual, J. A.; Hernandez, T.; García, C.; Ayunso, Miguel. (1998). Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: Laboratory experiment. *Bioresource Technology* 64,131-138.
- Peña, D., Albarrán, Á., Gómez, S., Fernández-Rodríguez, D., Rato-Nunes, JM, & López-Piñeiro, A. (2019). Efectos de los residuos de almazara con diferentes grados de madurez sobre el comportamiento del S-metolaclo-ro en tres suelos. *Geoderma* , 348 , 86-96.
- Pereg, L.; de-Bashan, L.E.; Bashan, Y. (2016). Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant and Soil*, 399, 389-414.
- Petersen, S.L., B.A. Roundy y R.M. Bryant. 2004. Revegetation methods for high elevation roadsides at Bryce Canyon National Park, Utah. *Restoration Ecol.* 12, 248-257. Doi: 10.1111/j.1061-2971.2004.00321.x
- Perucci, P., Dumontet, S., Casucci, C., Schnitzer, M., Dinel, H., Monaci, E., & Vischetti, C. (2006). Moist olive husks addition to a silty clay soil: influence on microbial and biochemical parameters. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 41 (6), 1019-1036.
- Pinho, IA, Lopes, DV, Martins, RC y Quina, MJ (2017). Evaluación de la fitotoxicidad de los residuos sólidos de almazara y la influencia de los compuestos fenólicos. *Chemosphere* , 185 , 258-267.
- Prisa, D. (2019). Effect of *Azospirillum brasilense* on garlic (*Allium sativum* L.) cultivation. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 02 (03), 008–013
- Programa para el aumento de la competitividad de la industria del tomate (PACIT). Informe progresos (2017). Disponible en:

https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_programa_para_el_aumento_de_la_competitividad_de_la_industria_del_tomate._informe_de_progresos_2016-2017.pdf. Acceso en Abril/2018

- Qasem, JR (2020). Control de colza (*Orobanche ramosa* L.) en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mediante orujos y aguas residuales de almazara. *Protección de Cultivos*, 129, 105021.
- Ramírez, C. A., & Kloepper, J. W. (2010). Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils*, 46(8), 835-844.
- Ratón, T. O., Portuondo, I. P., Salas, D. F., Ramos, N. C., & Giro, Z. G. (2005). Aislamiento de cepas del genero *Bacillus* sp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Química*, 17(1), 189-195.
- Reddy, S., Singh, A. K., Masih, H., Benjamin, J. C., Ojha, S. K., Ramteke, P. W., & Singla, A. (2018). Effect of *Azotobacter* sp and *Azospirillum* sp on vegetative growth of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(4), 2130-2137.
- Ribaudó, C. M., Krumpholz, E. M., Cassán, F. D., Bottini, R., Cantore, M. L., & Curá, J. A. (2006). *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(2), 175-185.
- Roberts, T. L. (2008). Improving nutrient use efficiency. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32(3), 177-182.
- Rodríguez L. (2019). Detoxificación de alperujo mediante fermentación en estado sólido. Magistrado de la UNSJ.
- Ros, M., Hernandez, MT y García, C. (2003). Actividad microbiana del suelo después de la restauración de un suelo semiárido mediante enmiendas orgánicas. *Biología y bioquímica del suelo*, 35 (3), 463-469.
- Saharan, B. S.; Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21, 1-30.
- SALAZAR, W. (1999). Cultivo de hortalizas. Artículo en línea]. Disponible en: http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/hortalizas/brocoli/competitividad_brocoli.pdf. Acceso en junio/2018.
- Sánchez Lopez, D. B., Gómez-Vsrgas, R. M., Gsriido Rubiano, M. F., & Bonilla Buitriago, R. R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1401-1415.

- Sánchez MG. 2016. Jornadas: Uso de Agroquímicos en Hortalizas de Hoja. Organizada por el en la Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires. Argentina.
- Santiago-López, G., Preciado-Rangel, P., Sánchez-Chávez, E., Esparza-Rivera, J. R., Fortis-Hernández, M., & Moreno-Reséndez, A. (2016). Organic nutrient solutions in production and antioxidant capacity of cucumber fruits. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(7), 518.
- Saradón, S. J., & Flores, C. C. (2014). Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables. Colección libros de cátedra. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, 5, 131-158.
- Schmidt, M. A., Kreinberg, A. J., Gonzalez, J. M., Halvorson, J. J., French, E., Bollmann, A., & Hagerman, A. E. (2013). Soil microbial communities respond differently to three chemically defined polyphenols. *Plant physiology and biochemistry*, 72, 190-197.
- Sharifazizi, M., Harighi, B., & Sadeghi, A. (2017). Evaluation of biological control of *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease of pear by antagonistic bacteria. *Biological control*, 104, 28-34.
- Smith, V. H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. *Environmental Science and Pollution Research*, 10(2), 126-139.
- Solórzano, R. J. J. (2014). Estimación de la fitotoxicidad de compost de lodos residuales utilizando *Raphanus sativus* L. Como planta indicadora. *Venesuelos*, 22(1).
- Soumare, M., F.M.G. Tack y M.G. Verloo. 2003. Effects of a municipal solid waste compost and mineral fertilization on plant growth in two tropical agricultural soils of Mali. *Bioresource Technol.* 86, 15-20. Doi: 10.1016/S0960-8524(02)00133-5
- Steenhoudt, O. y Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, una bacteria fijadora de nitrógeno de vida libre estrechamente asociada con las gramíneas: aspectos genéticos, bioquímicos y ecológicos. *Revisiones de microbiología de FEMS*, 24 (4), 487-506.
- Steiner, C., Teixeira, W. G., Lehmann, J., Nehls, T., De Macedo, J. L. V., Blum, W. E., & Zech, W. (2007). Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil. *Plant and Soil*, 291(1-2), 275-290.
- Sturosova, M.; Sunsabaugh, R. (2008). Stabilization of oxidative enzymes in desert soil may limit organic matter accumulation. *SoilBiology and Biochemistry*, 40, 550–553.
- Szczesny, A. F., & Adlercreutz, E. G. (2014). Producción hortícola bajo cubierta. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Ediciones INTA, 150 pp

- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Taladrid, I. J., & Espinosa, M. B. (2021). Seeds of radishes (*Raphanus sativus* L): Observations of its morphology under electron Microscopy, Germination and usefulness for phytotoxicity studies.
- Uribe, R. (2008). Ensayo de inhibición de la germinación y del alargamiento radicular en semillas de cebolla *Allium cepa* y soya *Glycine max*. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Editorial Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- Viola, CM, Torres-Carro, R., Verni, MC, del Valle Leal, E., Dall'Acqua, S., Rodrigues, F., ... & Arena, ME (2022). Interferencia en la producción de factores de virulencia bacteriana por residuos del procesamiento del aceite de oliva. *Biociencia de los alimentos* , 49 , 101883.
- Vishwakarma, K., Kumar, N., Shandilya, C., Mohapatra, S., Bhayana, S., & Varma, A. (2020). Revisiting plant–microbe interactions and microbial consortia application for enhancing sustainable agriculture: A review. *Frontiers in Microbiology*, 11, 560406
- Widnyana, I. K., & Javandira, C. (2016). Activities *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* sp. to stimulate germination and seedling growth of tomato plants. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 419-423.
- Yadav, K. K., & Sarkar, S. (2019). Biofertilizers, impact on soil fertility and crop productivity under sustainable agriculture. *Environment and Ecology*, 37(1), 89-93.
- Zelkind, M., Livingston, T., & Verlage, V. (2022). Indoor production of tomatoes. In *Plant Factory Basics, Applications and Advances* (pp. 295-305). Academic Press.