

Aplicación de un biosustrato compuesto por microorganismos y roca fosfórica sobre el cultivo de dos variedades de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Application of a biological substrate mixture composed by microorganisms and rock phosphates to two lettuce cultivars (*Lactuca sativa* L.)

Aplicação de um composto Biosubstrate por microorganismos e rocha de fosfato sobre o cultivo de duas variedades de alface (*Lactuca sativa* L.)

Erika Lorena Blanco^{1,2*} e Isbelia Reyes¹

¹Grupo de Investigación en Biotecnología Agrícola y Ambiental (GIBAA). Correo electrónico: elorenablancoc@gmail.com. ²Laboratorio de Biotecnología y Química de Polímeros (LIBQPOL). Decanato de Investigación. Universidad Nacional Experimental del Táchira. Apdo. 5001. San Cristóbal, Venezuela. Correo electrónico: isreyes@unet.edu.ve.

Resumen

El uso de microorganismos promotores del crecimiento permite una mayor disponibilidad de nutrientes para el desarrollo de las plantas bajo el manejo de una agricultura sostenible. En este trabajo se evaluó el potencial biofertilizante de dos microorganismos (la bacteria diazotrófica *Enterobacter cloacae* cepa BFN17 y el hongo disolvente de fosfatos *Penicillium rugulosum* cepa IRMF94), en un biosustrato compuesto por la roca fosfórica de San Joaquín de Navay (RFSJN) (10%), arena (85%) y sustrato orgánico compuesto de azúcar - arroz 50:50 (5%), con humedad al 20% sobre el desarrollo de dos variedades de lechuga Great Lakes (GL) y Black Seeded Simpson (BSS) en condiciones de campo. Se aplicaron cuatro tratamientos: testigo absoluto (sin fertilizantes químicos ni biosustrato), testigo comercial (con fertilizantes químicos y sin biosustrato), fertilización química con N + biosustrato y, fertilización química sin N + biosustrato, con cinco repeticiones. La fuente de N fue urea. El componente biológico del biosustrato se subdividió en BFN17, IRMF94, y consorcio BFN17+IRMF94. Se determinó el número de hojas, peso fresco, peso seco, y %P foliar de las lechugas. Los datos se analizaron

Recibido el 02-04-2018 • Aceptado el 22-10-2018

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: elorenablancoc@gmail.com.

mediante un ANOVA y la prueba LSD ($p < 0,05$) con el programa Statgraphics 5.1. La aplicación del biostrato inoculado con los dos microorganismos en forma de consorcio y con fuente de N en la variedad GL, presentó los mayores resultados para todas las variables analizadas respecto al resto de los tratamientos, encontrándose para esta variedad incrementos del 5% y 16,6% ($p < 0,05$) en número de hojas y el %P foliar, respectivamente, en relación al tratamiento comercial.

Palabras clave: inoculantes, sustentabilidad, consorcio microbiano, potencial biofertilizante, dinámica del N y P, efectividad agronómica.

Abstracts

The use of plant growth promoting microorganisms allows greater availability of nutrients for the development of plants under sustainable agriculture management. In this work, it was evaluated under field conditions. The biofertilizer potential use of two microorganisms (diazotrophic *Enterobacter cloacae* BFN17 strain and the phosphate solubilizing fungus *Penicillium rugulosum* IRMF94 strain), on the development of two lettuce cultivars, the Great Lakes (GL) and the Black Seeded Simpson (BSS), using a biological substrate mixture composed of San Joaquín de Navay rock phosphate (RFSJN) (10%), sand (85%) and an organic substrate composed of sugar - rice 50:50 (5%), the whole with 20% humidity. Four treatments were applied: an absolute control (without both, chemical fertilizers and biosubstrate), a commercial control (with chemical fertilizers but biosubstrate), a N chemical fertilization + biosubstrate, and a chemical fertilization without N + biosubstrate. The number of repetitions were five for each treatment. The N source was urea, and the biological treatments were the inoculants: BFN17, IRMF94, and the consortium BFN17+IRMF94. We evaluated number of leaves, fresh and dry weight, and %P foliar. Data were analyzed by ANOVA and LSD test ($p < 0.05$) using the Statgraphics program 5.1. The implementation of the biological substrate mixture of RFSJN inoculated with both microorganisms in the form of consortium and with the N source in the GL cultivar, showed the best results for all variables, having statistically ($p < 0.05$) similar results to the commercial treatment. It was found for the GL cultivar, 5% and 16.6% increases in the number of leaves and the %P foliar, respectively.

Key words: Inoculants, sustainability, microbial consortium, biofertilizer potential, N and P dynamics, agronomic effectiveness.

Resumo

O uso de microrganismos de promoção do crescimento permite uma maior disponibilidade de nutrientes para o crescimento das plantas sob a gestão da agricultura sustentável. Neste trabalho, um potencial fertilizante organomineral de dois microrganismos (o diazotróficos estirpe *Enterobacter cloacae* BFN17 e o solvente de fosfato fungo *Penicillium rugulosum* estirpe IRMF94) em um

Biosubstrate comprendiendo rocha de fosfato de San Joaquin Navay (RFSJN) (10% foi avaliada), areia (85%) e de açúcar composto substrato orgânico - arroz 50:50 (5%), com 20% de humidade relativa ao desenvolvimento de duas variedades de alface Grandes Lagos (GL) e preto, semeado Simpson (BSS) sob condições de campo. Controlo absoluta (sem produtos químicos ou fertilizantes Biosubstrate), o controlo comercial (com fertilizantes químicos e sem Biosubstrate), adubação química com N + Biosubstrate e fertilização química sem N + Biosubstrate, com cinco repetições: quatro tratamentos foram aplicados. A fonte de N era a ureia. O componente biológica de Biosubstrate foi subdividido em BFN17, IRMF94 e BFN17 + IRMF94 consórcio. Determinou-se o número de folhas, o peso fresco, a massa seca e a% P da folha da alface. Os dados foram analisados por ANOVA e teste de LSD ($p < 0,05$) com 5,1 programa Statgraphics. A aplicação de Biosubstrate inoculadas com os dois microorganismos como uma fonte de N e consórcio na gama GL, proporcionou os melhores resultados para todas as variáveis analisadas em relação a outros tratamentos, sendo para este intervalo de aumentos de 5% e 16 6% ($p < 0,05$) no número de folhas e folha P%, respectivamente, em relação ao tratamento comercial.

Palavras-chave: inoculantes, sustentabilidade, consórcio microbiano, biofertilizante potenciais dinâmica de N e P, eficiência agronômica

Introducción

La forma más utilizada para incorporar el N y el P al suelo en la producción agrícola es la aplicación de fertilizantes químicos que contengan estos elementos. Dicha utilización de agroquímicos para la obtención de mayores rendimientos en los cultivos es una práctica muy común en Venezuela, especialmente en la región andina, donde los cultivos de hortalizas se realizan de manera intensiva formando parte del alimento de la población en general (Blanco *et al.*, 2013). En las últimas décadas el uso de los fertilizantes químicos ha sido indiscriminado, lo que ha modificado significativamente el equilibrio ecológico del suelo alterando las poblaciones microbianas,

Introduction

In Agriculture, the most common practice to incorporate N and P into the soil is through application of inorganic fertilizers that contain those elements. The utilization of those agrochemicals to increase crop yield is common in Venezuela, particularly in the Andean region, where vegetable production is very intensive as they are a very important diet component of common people (Blanco *et al.*, 2013). In the last decades, the inorganic fertilizer use has been indiscriminate changing soil ecological equilibrium due to microorganism population alteration, soil acidification, salt concentration increase and organic matter reduction, which affect directly crop development. On the

acidificando y aumentando los contenidos de sales, y disminuyendo la materia orgánica en el mismo, lo que ha afectado directamente el desarrollo de los cultivos. Por otro lado, la disponibilidad de nutrientes en el suelo para las plantas es limitada, por esta razón la utilización de rocas fosfóricas con la aplicación de microorganismos fijadores de nitrógeno y disolventes de fosfatos, permitirá tener más elementos de manejo para una agricultura sostenible para rubros como las lechugas, los cuales con un manejo biológico incrementarán su calidad.

De acuerdo con la FAO (2007), se denomina roca fosfórica a todos los minerales presentes en la naturaleza que contienen alta concentración de fosfatos ($> 30\% P_2O_5$). Las rocas fosfóricas pueden ser utilizadas bien sea como materia prima para la fabricación industrial de fertilizantes fosfatados solubles en agua o como fuentes de fósforo para la aplicación directa en la agricultura. En valores reportados por la British Geological Survey y tomados del trabajo realizado por el equipo del Dr. Eduardo Casanova de la Universidad Central de Venezuela, se muestra que las rocas fosfóricas de Monte Fresco y Navay presentes en el estado Táchira (Venezuela), por ejemplo, son de mediana reactividad, produciendo valores de efectividad agronómica en el orden de hasta un 80% (Salas 1989; Appleton and Notholt, 2002).

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) incluyen rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV)

other hand, ready available nutrients in the soil are limited, therefore the rock phosphate use along with microorganisms that fix nitrogen or solubilize phosphate will contribute to a better soil management in a sustainable agriculture for produce such as lettuces, whose quality can be improved with a better soil biology.

According to FAO (2007), rock phosphates are all rocks present in the nature that contain high phosphorous concentration ($> 30\% P_2O_5$). Rock phosphates are used as a raw material for either manufacturing water-soluble phosphate fertilizers or phosphorous sources to be used directly in agriculture. British geological survey cited Dr. Eduardo Casanova *et al.* from the Universidad Central de Venezuela, whose study showed that rock phosphate from Monte Fresco and Navay, Táchira (Venezuela), had medium chemical reactivity with agronomic effectiveness values that reached 80% (Salas 1989; Appleton and Notholt, 2002).

The plant growth promoting microorganisms (PGPM) include rhizobacteria (PGPR), solving phosphate microorganisms (SPM) and other symbionts such as arbuscular mycorrhizas (AM), these microorganisms grow associated with their host root systems and microhabitats of rhizosphere, promoting plant growth due to an increment of nutrient availability via different direct and indirect mechanisms. The direct mechanisms are N fixation, phytohormone synthesis and phosphate dissolution mainly as result of organic acid

microorganismos disolventes de fosfatos (MDF) y otros simbioses como las micorrizas arbusculares (MA) que crecen asociados a raíces de plantas hospederas y en microhabitats de la rizósfera, produciendo una estimulación del crecimiento de las plantas por el incremento en la disponibilidad de nutrientes mediante distintos mecanismos de acción directos como la fijación de N, producción de fitohormonas, y disolución de fosfatos principalmente, por producción de ácidos orgánicos; mientras que los mecanismos indirectos promueven la salud de las plantas controlando fitopatógenos o induciendo resistencia sistémica (Vessey, 2003; Antoun, 2012).

Los estudios sobre la utilización de sustratos orgánicos por los microorganismos para disolver fosfatos han sido escasos. Reyes *et al.*, (1999a) y Reyes *et al.*, (1999b), utilizando a *Penicillium rugulosum* cepa IRMF94 en condiciones de laboratorio, encontraron una mayor disolución de fosfatos de calcio y de hierro cuando se utilizó la sacarosa como fuente de carbohidratos, y arginina, nitrato, y nitrato + amonio como fuentes de nitrógeno. También ha sido reportado por Barroso *et al.* (2006), que la disolución de fosfatos por microorganismos es mayor cuando éstos utilizan como fuente de carbohidratos galactosa, maltosa o sacarosa, y el nitrógeno en forma amoniacal. Asimismo, Hwangbo *et al.* (2003) reportaron para el caso de *Enterobacter intermedium*, la disolución de fosfatos por medio de la producción de ácido cetoglucónico

production. Whereas, the main indirect mechanism is plant health promotion through phytopathogen control or systemic resistance induction (Vessey, 2003; Antoun, 2012).

Few studies evaluate the use of phosphate solvng microorganisms in organic substrates. In laboratory conditions, a *Penicillium rugulosum* IRMF94 strain dissolved larger concentrations of calcium and iron phosphate when sucrose was the carbohydrate source in addition to arginine and nitrate and nitrate + ammonium as nitrogen source (Reyes *et al.*, 1999a and Reyes *et al.*, 1999b). Likewise, phosphate dissolution by microorganism is high when they use galactose, maltose or sucrose as carbohydrate sources and ammoniacal nitrogen (Barroso *et al.*, 2006). Hwangbo *et al.* (2003) reported that *Enterobacter intermedium* dissolved phosphates through cetogluconic acid derived from glucose, whereas hydroxyapatite dissolution by *P. rugulosum* IRMF94 strain was correlated significantly with gluconic acid production and low pH (Reyes *et al.*, 1999a).

Based on these previous studies, two microorganisms: *P. rugulosum* IRMF94 strain, and a diazotrophic bacterium *E. cloacae* BFN17 strain were evaluated as a potential biofertilizer. These microorganisms were isolated from a phosphate mine located in Monte Fresco (Reyes *et al.*, 1999a and Reyes *et al.*, 2006). The inoculum carrier was a bio-substrate made up of rock phosphates from San Joaquín de Navay (RFSJN), sugar and rice. Two lettuce cultivars

a partir de glucosa, mientras que para *P. rugulosum* cepa IRMF94 la disolución de la hidroxapatita ha sido correlacionada significativamente con la producción del ácido glucónico y el descenso del pH (Reyes *et al.*, 1999a).

Sobre la base de estas investigaciones se evaluó el potencial biofertilizante de dos microorganismos, el hongo disolvente de fosfatos *P. rugulosum* cepa IRMF94, y la bacteria diazotrófica *E. cloacae* cepa BFN17, ambos microorganismos aislados previamente de la mina de fosfatos de Monte Fresco (Reyes *et al.*, 1999a y Reyes *et al.*, 2006), utilizando como transportador de los inoculantes un biosustrato compuesto por la roca fosfórica de San Joaquín de Navay (RFSJN), azúcar y arroz, sobre el desarrollo de dos variedades de lechuga en condiciones de campo. Se escogió este cultivo por ser de ciclo corto (favorable para ensayos experimentales de crecimiento vegetal), de importancia económica en la producción agrícola regional, y por tener altos requerimientos nutricionales (Sánchez, 2014; De Oliveira *et al.*, 2018).

Materiales y métodos

Preparación y viabilidad de un biosustrato con RFSJN

Se preparó un biosustrato compuesto por RFSJN tamizada a 0,149 mm, malla N° 100, arena de río tamizada a 850 micrones, malla N° 20, y sustrato orgánico triturado compuesto de azúcar comercial y arroz partido comercial en la proporción 50:50, los cuales representaron en la

were evaluated in field conditions. Lettuce was chosen because it has a short production cycle (desirable characteristic for experiments on plant growth), its economic significance for the regional agriculture and its high nutrient demand (Sánchez, 2014; De Oliveira *et al.*, 2018).

Materials and Methods

Preparation and viability of a bio-substrate amended with RFSJN

A bio-fertilizer was prepared mixing rock phosphates, sifted through 0.149-mm sieve, No. 100, river sand sifted to obtain 850-micron particles, sieve No. 20, with ground organic substrate that contained sugar and commercial rice at 50:50 ratio, these components were mixed to obtain a bio-fertilizer of 10%, 85% and 5%, respectively, at 20% moist and sterile conditions. the RFSJN chemical composition is shown in table 1. The bio-substrate was standardized previously as followed: 50 g bio-substrate was used to evaluate three organic matter treatments with three replications each: 5% sugar, 5% rice and 50-50 sugar-rice. Each treatment was transfer to a baby food jar covered with aluminum foil for further sterilization. Thereafter, an IRMF94 inoculum was diluted in a 1 mL saline solution 0.89 % NaCl to reach a concentration 1×10^7 cel. mL⁻¹

Afterwards, phosphate solubilizing activity of IRMF94 was evaluated for 17 days. Soluble P was determined using Bray y Kurtz method (Sarker *et al.*, 2014) to determine the most efficient substrate. The two chosen

composición del biosustrato el 10%, 85% y 5%, respectivamente, con humedad al 20%, y en condiciones estériles. La composición química de la RFSJN se observa en el cuadro 1. El biosustrato se estandarizó previamente. Para ello se colocaron 50 g del biosustrato en el que se evaluaron los sustratos orgánicos en tres tratamientos con tres repeticiones: azúcar 5%, arroz 5%, y la proporción 50-50 de ambos, en envases de compota cubiertos con papel aluminio, y se esterilizaron. Posteriormente, se inoculó al hongo IRMF94 en 1 mL de solución salina NaCl 0,89% una concentración de 1×10^7 cel.mL⁻¹, y se determinó la actividad disolvente de fosfatos realizada por este hongo durante 17 días, midiendo el P soluble por el método de Bray y Kurtz (Sarker *et al.*, 2014), para conocer el sustrato más eficiente para esta actividad. Posteriormente, los dos microorganismos seleccionados (la bacteria diazotrófica *E. cloacae* cepa BFN17, y el hongo disolvente de fosfatos *P. rugulosum* cepa IRMF94), provenientes del laboratorio de Biofertilizantes de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), Venezuela, se inocularon a 1×10^7 cel.mL⁻¹ en forma individual y en los tratamientos separados. La mezcla inoculada se mantuvo a 4°C y se caracterizó durante siete días a través de las mediciones de P soluble, conductividad eléctrica (1:5), pH (1:5) (utilizando un conductímetro marca Hanna modelo HI 9813-0 y un pH-metro marca Crison modelo 507), humedad (por diferencia de peso húmedo y seco a las 24 h a 105 °C), y la actividad de los microorganismos mediante una curva de viabilidad a través de diluciones seriadas (Madigan *et al.*, 2003).

microorganisms, a diazotrophic bacterium, *E. cloacae* BFN17, and a phosphate solubilizing fungus, *P. rugulosin* IRMF94) were isolated at the bio-fertilizer laboratory of the Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), Venezuela. These microorganisms were inoculated at 1×10^7 cel.mL⁻¹ individually and in separated treatments. The inoculated substrate was kept at 4°C and characterized for seven days considering the following parameters: soluble P determinations, electric conductivity (1:5), pH (1:5) water content and dry weight. A conductometer Hanna model HI 9813-0 was utilized to measure electrical conductivity, a pH-meter Crison model 507 was used to determine pH, moist content was determined gravimetrically by difference between wet and dry weight after oven drying the substrate for 24 h at 105 °C. The microorganism activity was evaluated via a viability curve using serial dilutions (Madigan *et al.*, 2003).

Field experiment

This study was carried out at the Unidad Académica “La Primavera”, UNET (Andrés Bello County, Cordero, Tachira State, Venezuela) at 1,125 MASL, coordinates 19°N 0171707 UTM 0853482. The soil is characterized as sandy loamy, moderately acidic with moderate content of P, where pepper, corn, lettuce, and potatoes were grown before this experiment. Soil physical and chemical properties are shown in table 1. Once the bio-substrate production was standardized (sugar: rice, 50:50), it was inoculated with

Cuadro 1. Características físico químicas del suelo de la Unidad Experimental “La Primavera” (UNET) y la RFSJN.

Table 1. Soil physical and chemical characteristics of the Unidad Experimental “La Primavera” (UNET) and rock phosphate of San Joaquín de Navay (RFSJN.)

Material	Características físico químicas										
	Textura (Bouyucos)	M.O (Walkley y Black)	P (Bray I)	pH (1:2,5)	C.E (1:5)	K (Acetato de amonio)	Ca (Acetato de amonio)	Mg (Acetato de amonio)			
Suelo “La Primavera”		%	mg.kg ⁻¹		mS.cm ⁻¹	mg.kg ⁻¹	mg.kg ⁻¹	mg.kg ⁻¹			
	Franco arenosa	3	57,64	5,7	0,23	405	2332	223			
RFSJN	P	Ca	Mg	Na	K	Mn	Fe	Cu	Al	Zn	Si
	93	200	0,2	1,6	0,4	0,03	2,0	0,02	3,5	0,08	193,7
							mg.g ⁻¹				

RFSJN = roca fosfórica de San Joaquín de Navay

Blanco (2014); Reyes *et al.* (2001).

Experimento de campo

El estudio se realizó en la Unidad Académica “La Primavera”, finca perteneciente a la UNET (municipio Andrés Bello, Cordero, estado Táchira, Venezuela), a una altitud de 1.125 msnm, con coordenadas 19° N 0171707 UTM 0853482. Se utilizó un suelo franco arenoso, medianamente ácido y contenido medio de P donde se cultivó previamente pimentón, maíz, lechuga y papa); las características físico químicas del suelo se muestran en el cuadro 1. Una vez estandarizada la producción del biostrato (50:50 azúcar-arroz), se inoculó con los dos microorganismos señalados (relación 1:1) a una concentración de 1×10^8 cel. ml^{-1} cada uno, en forma individual y en consorcio. Estos biostratos se evaluaron en condiciones de campo sobre dos variedades de lechuga, Great Lakes (GL) y Black Seeded Simpson (BSS), cuyas semillas certificadas de la GL se obtuvieron en una casa comercial de la ciudad, y la BSS por donación de un productor. Las semillas de las dos variedades de lechuga se limpiaron mediante lavado con solución jabonosa al 1% durante 5 min, seguido de 5 enjuagues con agua desmineralizada estéril, según protocolo estandarizado previamente en el laboratorio. Estas se sembraron en bandejas de horticultura de 200 macetillas, provistas de un sustrato comercial marca Stender, se mantuvieron en condiciones de umbráculo por 30 días, se regaron con agua corriente y con frecuencia interdiaria se agregó la solución Hoagland a $\frac{1}{4}$ de su potencia. Luego, las plántulas de 30 días se trasladaron

previously mentioned microorganisms at 1×10^8 cel. mL^{-1} each (1:1 ratio), single and combined. These bio-substrates were field evaluated using two lettuce cultivars: Great Lakes (GL) y Black Seeded Simpson (BSS), commercial seeds from GL were chosen, whereas BSS seeds were provided by a grower. Seeds were washed using soapy water at 1% for 5 min, followed by five rinses with demineralized sterilized water, according to a previously standardized laboratory protocol. Seeds were planted in 200-cell trays that contained a commercial substrate Stender. Seedlings were grown in a lath house for 30 days. Irrigation was completed with tap water and $\frac{1}{4}$ th strength Hoagland’s nutrient solution was applied every other day. Thirty-day-old seedlings were transported to “La Primavera” farm and planted in three raised beds (1.20 m wide x 12 m long). Seedlings were 25 cm apart, which corresponds to a plant density of 86,000 plants. ha^{-1} . At each planting hole, 50 g inoculated bio-substrate previously stored at 4 °C, according to each treatment, was spread manually wearing medical-grade laboratory gloves to avoid any cross contamination, then seedlings were planted along with the root ball. Five days after planting, chemical treatments were applied. Two factorial design arranged in plots in completely randomized design, with two factors: a biological and a chemical. Four treatments were applied: absolute control, (no fertilizer neither bio-substrate), commercial control (chemical fertilizer, without bio-substrate) chemical fertilizer with N

a la finca La Primavera, en donde previamente se prepararon tres canteros de 1,20 m de ancho x 12 m de largo y se sembraron a una distancia de 25 cm entre ellas, correspondiendo a una densidad de siembra de 86.000 plantas.ha⁻¹. Para cada hoyo realizado en el punto de siembra, se colocaron 50 g del biosustrato inoculado previamente y almacenado a 4°C, según cada tratamiento. El biosustrato se esparció con guantes quirúrgicos para evitar contaminación entre tratamientos y luego se introdujo cada cepellón de la lechuga y se cubrió con el suelo. A los cinco días de siembra se aplicaron los tratamientos químicos. En el experimento se usó un diseño bifactorial dispuesto en parcelas completamente aleatorizadas, con un factor biológico y un factor químico. Se aplicaron cuatro tratamientos químicos: testigo absoluto (sin fertilizantes químicos ni biosustrato), testigo comercial (con fertilizantes químicos y sin biosustrato), fertilización química con N + biosustrato y, fertilización química sin N + biosustrato. La fuente de N fue urea. El componente biológico del biosustrato fue la inoculación con BFN17, IRMF94, consorcio BFN17+IRMF94, y un testigo no inoculado. La aplicación de los tratamientos químicos se realizó usando el criterio de fertilización química por restitución y disponibilidad de nutrientes para N y P. Para la dosis aplicada se consideró una eficiencia de 70, 60 y 80% para N, P₂O₅ y K₂O, respectivamente (Silva, 1988). En el factor químico se consideraron los requerimientos de la lechuga de

+ bio substrate and chemical fertilizer without N + bio-substrate. Urea was used as N source. The biological component of the bio-substrate was the inoculation with BFN17, IRMF94, consortium BFN17+IRMF94 and the control without inoculum. The chemical treatment application was based on the chemical fertilization by the restitution criterion and N and P availability. The dosage was based on efficiencies of 70, 60 and 80% for N, P₂O₅ and K₂O, respectively (Silva, 1988). For the chemical factor, it was considered lettuce's nutrient requirements: de 68, 21 and 130 kg.ha⁻¹ N, P₂O₅ and K₂O respectively (IFA, 1992). The phosphorous dosage for RFSJN was 500 kg.ha⁻¹ in order to meet the P₂O requirements of the crop, which is 21 kg.ha⁻¹. The treatments were: absolute control, (0N/0P/100K), commercial control (100N/100P/100K) and absolute control + bio-substrate with or without N application (0N/100RFSJN/100K and 100N/100RFSJN/100K). The 100% number represents 100% of crop's nutrient requirement. All treatments were repeated five times. The experimental unit was a lettuce plant. The weed control was manually, plants were watered using sprinklers and insecticide pellets were applied at planting. Harvest was done at the end of the experiment (six weeks for BSS cultivar and eight weeks for GL cultivar according to their life cycle). At the end of the experiment, number of leaves, fresh and dry weights and the %P foliar for each cultivar, through colorimetric method by Watanabe and Olsen, were evaluated (Kumar and Dey, 2011).

68; 21 y 130 kg.ha⁻¹ de N, P₂O₅ y K₂O respectivamente, según el IFA (1992). La dosis de fósforo planteada para la utilización de RFSJN fue de 500 kg.ha⁻¹ para cubrir la demanda de P₂O del cultivo, la cual es de 21 kg.ha⁻¹. Los tratamientos se establecieron finalmente de la siguiente manera: testigo absoluto (0N/0P/100K), testigo comercial (100N/100P/100K) y testigo absoluto + biostrato con o sin la aplicación de N (0N/100RFSJN/100K y 100N/100RFSJN/100K). El número 100 representa el 100% del requerimiento del nutriente. Todos los tratamientos se evaluaron con 5 repeticiones cada uno. La unidad experimental fue la planta de lechuga. El deshierbe fue manual, el riego por aspersión, y el control de plagas se realizó al momento de la siembra utilizando cebos envenenados. Las plantas de lechuga se cosecharon al final del experimento (6 semanas para la variedad BSS y 8 semanas para la variedad GL de acuerdo a su fenología). Al finalizar el ensayo, se determinó el número de hojas, el peso fresco, el peso seco (determinado por la diferencia entre el peso seco y el peso fresco de cada muestra después de secar en estufa a 60°C), y el %P foliar para cada variedad de lechuga se realizó por colorimetría con el método de Watanabe y Olsen (Kumar y Dey, 2011).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un ANOVA y la prueba LSD ($p < 0,05$) con el programa Statgraphics 5.1. Sin embargo, los resultados de las variables de peso fresco, peso seco aéreo y extracción total de fósforo

Statistical Analysis

Data were analyzed using ANOVA and mean comparison was determined using LSD ($p < 0,05$) using the software Statgraphics 5.1. A non-parametric method, Kruskal-Wallis test was applied to fresh weight and upper plant dry weight and total phosphorous.plant⁻¹ using the Infostat software since these data did not meet the assumptions of normal distribution and homogenous variance (Montgomery, 1991).

Results and discussion

Dynamic of RFSJN bio-substrate

The inoculated microorganisms in the bio-substrate did not show solving phosphate activity at 4°C neither important changes of CE, pH and humidity. The humidity persisted at 24%. The viability of the BFN17 and IRMF94 strains were around 1×10^6 CFU.mL⁻¹ until day 7 when the experiment finished (figure 1). Figures 1a and 1b show soluble phosphorous and CE, respectively in the bio-substrate during 7 days. These two variables had similar trend as the control, this response indicated that inoculated microorganism were latent, since there was no dissolving phosphate activity, no variation of CE and pH (figure 1a, 1b and 1c), which indicate a latent metabolic under these conditions. Regarding microorganism viability (figure 1d), it was noticed that both, BFN17 bacterium and IRMF94 fungus were around 1×10^6 CFU.mL⁻¹ from the beginning until the end of the experiment, with no

por planta en condiciones de campo para cada variedad de lechuga, se sometieron a la prueba de Kruskal Wallis con el programa estadístico Infostat, debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas (Montgomery, 1991).

Resultados y discusión

Dinámica del biosustrato de RFSJN

Los microorganismos inoculados en el biosustrato y mantenidos a 4°C no mostraron actividad disolvente de fosfatos, ni variaciones importantes de CE, pH y humedad, esta última se mantuvo constante en 24%. La viabilidad de las cepas microbianas BFN17 e IRMF94 se mantuvo en el orden de 1×10^6 UFC.mL⁻¹ hasta los 7 días que duró el experimento (figura 1). En la figura 1a y 1b se observa respectivamente el fósforo soluble y la CE determinada en el biosustrato durante los 7 días de duración del experimento, en los cuales hubo una tendencia a mantenerse entre los mismos valores en comparación al testigo, para los dos parámetros medidos. Estos resultados señalan que los microorganismos inoculados se mantuvieron latentes al no mostrar actividad disolvente de fosfatos, no presentando variaciones importantes de CE y de pH (figura 1a, 1b y 1c), lo que señala una actividad metabólica en latencia bajo estas condiciones. En cuanto a la viabilidad de los microorganismos (figura 1d) se observó que ambos, la bacteria BFN17 y el hongo IRMF94, se

significant increment. Therefore, the storage conditions of bio-substrate before field use was appropriate, since it did not show any decrease of biological activity. Regarding non-inoculated control, no contamination was noticed on the substrate due to cellular growth, which indicates that the protocol utilized to prepare RFSJN, sand and sugar-rice was completed under optimal sterility and feasible conditions.

Biofertilizer potential of a bio-substrate for GL and BSS lettuces

It is shown in table 2 that the analyzed variables were not significant ($p < 0.05$) different for the control with RFSJN compared with absolute control. Likewise, it was observed no significantly ($p < 0.05$) favorable effect by adding inoculants to the treatments without N and with RFSJN on all variables for the two lettuce cultivars. This suggests that N is an essential element in this soil, not only for lettuce development but also for the activity of native microbiome, inoculants and therefore for the expression promoting mechanisms of plant growth. According to Zagal (2005), and Barton and Northup (2011), the N transformation in the soil, through mineralization and immobilization, is accomplished by microorganisms and the transformation of other nutrients such P are related with biochemical transformation of N in the soil. Now, the application of phosphate rock in a soil with low N content, could mainly favor the native microbiota,

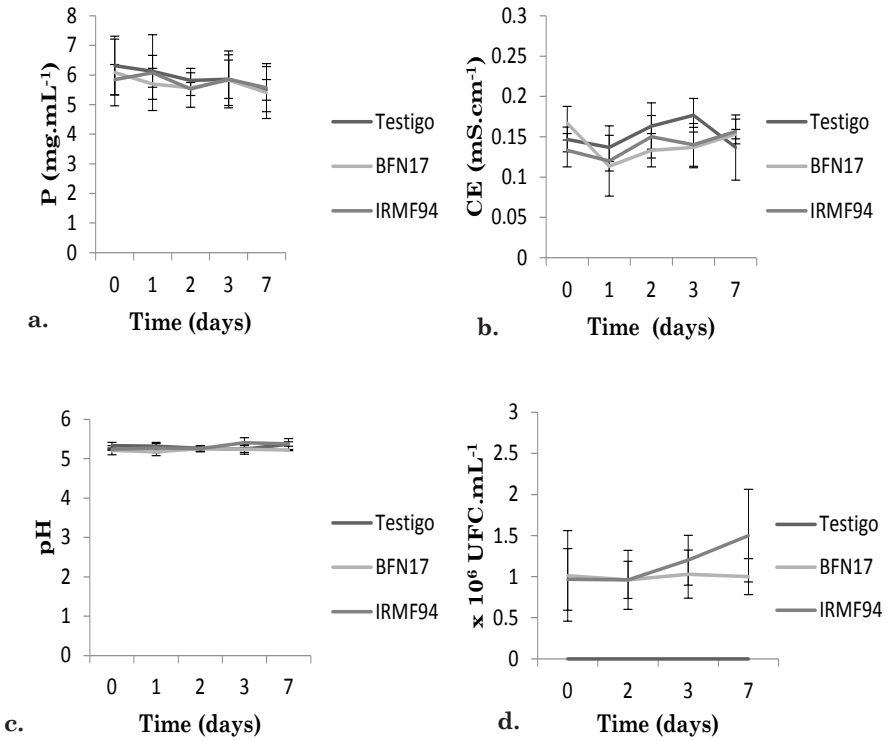


Figura 1. Caracterización del biostrato de RFSJN, arena, azúcar-arroz y los inoculantes BFN17 e IRMF94 a 4°C de acuerdo a parámetros evaluados: a. P soluble, b. CE (1:5), c. pH (1:5) y d. Viabilidad de los microorganismos. Tratamientos: Testigo = no inoculado, BFN17 = bacteria fijadora de nitrógeno, IRMF94 = hongo disolvente de fosfatos.

Figure 1. Characterization of RFSJN bio-substrate, sand, sugar-rice and BFN17 and IRMF94 inoculants at 4oC according to evaluated parameters: a. soluble P, b. CE (1:5), c. pH (1:5) and d. microorganism viability. Treatments: Control = non-inoculated, BFN17 = N fixing bacterium, IRMF94 = dissolving phosphate fungus.

expresaron en el orden de 1×10^6 UFC. ml^{-1} desde el comienzo hasta el final del experimento, no observándose ningún incremento significativo. De esta manera, el almacenamiento del biosustrato en las condiciones señaladas para su posterior uso en campo fue adecuado, al no mostrar una disminución de su actividad biológica. Con respecto al testigo no inoculado tampoco se observó contaminación en el biosustrato por crecimiento celular, lo que indicó que el procedimiento empleado para preparar la composición de RFSJN, arena y azúcar-arroz, se realizó bajo condiciones óptimas y confiables de esterilidad.

Potencial biofertilizante del biosustrato para las lechugas GL y BSS

En el cuadro 2 se observa que en el testigo con la aplicación de la RFSJN las variables vegetales analizadas no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) respecto al testigo absoluto. Igualmente, se observa que no hubo ningún efecto favorable significativo ($p < 0,05$) al adicionar los inoculantes a los tratamientos sin N y con RFSJN, sobre las variables medidas en las plantas para las dos variedades de lechuga. Esto sugiere que el N es un elemento imprescindible en este suelo, no solo para el desarrollo del cultivo de la lechuga sino también para la actividad de la microflora autóctona, de los inoculantes, y por ende la expresión de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal. Según Zagal (2005), y Barton y Northup (2011), la transformación

preventing the plant to use nutrients release from phosphate dissolution.

By adding N to inoculated treatments that contained the biosubstrate: RFSJN 100N/RFSJN/100K + BFN17, 100N/RFSJN/100K + IRMF94, and 100N/RFSJN/100K + consortium, and comparing with similar treatment with no N, it can be noticed that N addition increased significantly ($p < 0.05$) leaf number, upper fresh and dry weight ($p < 0.05$) for 100N/RFSJN/100K + consortium treatment, reaching 70%, 660% y 280% for GL lettuce, and 60%, 387% and 346% for BSS lettuce, respectively. This increment caused by N addition to soil, showed that nitrogen needed for plant growth was not provided by BFN17 bacterium, as it is noticed on the inoculated control. Overall, in horticultural crops the limiting factor of plant yield is the scarcity of N in the soil (Aruani *et al.* 2008; Cerón and Aristizábal, 2012), and as indicated in lettuce by Vitousek *et al.*, (2010) and De Grazia *et al.* (2001), when N is limited in presence of enough ready available P quantity, plants cannot build up biomass or tissue.

Studies, conducted by Valery and Reyes (2013), reported positive effect of bacterial strains, MFS and the consortium MFS+MF1b (a phosphate dissolving bacterial strain and a N fixing free-living bacterium, respectively) on dry weight increase of corn grains and the agronomic efficiency of corn HIMECA-95, when it was compared with non-inoculated treatment, subjected to fertilization with N and K. Similarly, other

Cuadro 2. Efectos de la aplicación del biostrato de RFSJN inoculado con los microorganismos promotores del crecimiento vegetal sobre algunas variables del crecimiento de las variedades GL y BSS de la lechuga en condiciones de campo.
Table 2. Effects of the application of RFSJN bio-substrate, inoculated with plant growth promoting microorganisms, on some growth variables in GL and BSS lettuce cultivars in field conditions.

Variable	Tratamiento / Variedad																	
	0N/0P/100K no inoculado (Testigo absoluto)	0N/RFS-JN/100K inoculado	0N/RFS-JN/100K no inoculado	0N/RFS-JN/100K + IRMF94	0N/RFS-JN/100K + BFN17	0N/RFS-JN/100K + BFN17 + IRMF94	0N/RFS-JN/100K + consorcio (BFN17 + IRMF94)	100N/RFS-JN/100K + BFN17	100N/RFS-JN/100K + IRMF94	100N/RFS-JN/100K + consorcio (BFN17 + IRMF94)	100N/100P/100K (Testigo comercial no inoculado)							
GL	BSS	GL	BSS	GL	BSS	GL	BSS	GL	BSS	GL	BSS	GL	BSS					
26.2	21.0	18.0	16.0	23.0	13.6	19.6	19.0	19.0	15.2	27.2	25.8	29.6	25.4	32.4	24.0	30.8	31.2	
CD	cd	F	ef	DE	f	EF	de	F	f	BC	b	ABC	b	A	bc	AB	a	
Peso fresco aéreo (g)	137.72	65.26	61.49	32.88	105.47	18.25	76.77	53.07	66.53	24.47	426.93	170.82	437.72	157.07	507.37	117.63	735.61	309.12
	BCD	bed	D	d	CD	d	D	cd	D	d	ABC	ab	AB	abc	AB	abc	A	a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de medias LSD a un nivel de confianza del 95%. Las letras mayúsculas hacen referencia a la prueba de medias de la variedad GL y las letras minúsculas de la variedad BSS. Tratamientos químicos: Testigo absoluto= 0N/0P/100K; testigo comercial no inoculado: 100N/100P/100K; testigo + biostrato (0N/RFSJN/100K). El número 100 representa el 100% del requerimiento del nutriente Tratamientos biológicos: Testigo = no inoculado, BFN17 = bacteria fijadora de nitrógeno, IRMF94 = hongo disolvente de fosfatos, consorcio = BFN17 + IRMF94.

Cuadro 2. Efectos de la aplicación del biosustrato de RFSJN inoculado con los microorganismos promotores del crecimiento vegetal sobre algunas variables del crecimiento de las variedades GL y BSS de la lechuga en condiciones de campo (Continuación).

Table 2. Effects of the application of RFSJN bio-substrate, inoculated with plant growth promoting microorganisms, on some growth variables in GL and BSS lettuce cultivars in field conditions. (Continuation).

Variable	Tratamiento / Variedad																
	0N/0P/100K no inoculado (Testigo absoluto)	0N/RFS-JN/100K no inoculado	0N/RFS-JN/100K + BFN17	0N/RFS-JN/100K + IRMF94	0N/RFS-JN/100K + consorcio (BFN17 + IRMF94)	100N/ RFS-JN/100K + BFN17	100N/RFS-JN/100K + IRMF94	100N/RFS-JN/100K + consorcio (BFN17 + IRMF94)	100N/100P/100K (Testigo comercial no inoculado)								
Peso seco aéreo (g)	9,37 AB	5,25 B	2,23 de	6,44 B	1,37 e	5,95 B	2,95 cde	5,55 B	1,78 de	16,13 A	10,90 ab	21,51 A	11,32 abc	21,10 A	7,95 abc	25,31 A	27,63 a
% P foliar	0,25 BC	0,40 bc	0,27 BC	0,41 abc	0,31 AB	0,38 c	0,25 BC	0,40 bc	0,29 AB	0,23 C	0,44 ab	0,26 BC	0,39 c	0,35 A	0,40 bc	0,30 AB	0,45 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de medias LSD a un nivel de confianza del 95%. Las letras mayúsculas hacen referencia a la prueba de medias de la variedad GL y las letras minúsculas de la variedad BSS. Tratamientos químicos: Testigo absoluto= 0N/0P/100K; testigo comercial no inoculado: 100N/100P/100K; testigo + biosustrato (0N/RFSJN/100K). El número 100 representa el 100% del requerimiento del nutriente Tratamientos biológicos: Testigo = no inoculado, BFN17 = bacteria fijadora de nitrógeno, IRMF94 = hongo disolvente de fosfatos, consorcio = BFN17 + IRMF94.

del N en el suelo a través de la mineralización y la inmovilización son realizados por la vida microbiana y las transformaciones de otros nutrientes como el P, están relacionadas con las transformaciones bioquímicas del N. Ahora bien, la aplicación de la roca fosfórica en un suelo con bajo contenido de N, podría favorecer principalmente a la microbiota autóctona, impidiendo que la planta se beneficie de los nutrientes liberados por la disolución del mineral.

Al agregar N en los tratamientos inoculados que contienen el biosustrato RFSJN: 100N/RFSJN/100K + BFN17, 100N/RFSJN/100K + IRMF94, y 100N/RFSJN/100K + consorcio, con respecto a los tratamientos equivalentes sin N, se pudo observar que la adición del N incrementó los valores del número de hojas, del peso fresco aéreo y del peso seco aéreo en forma altamente significativa ($p < 0,05$) en el tratamiento 100N/RFSJN/100K + consorcio, observándose un incremento de 70%, 660% y 280% en la variedad GL, y 60%, 387% y 346% en la variedad BSS para esas variables, respectivamente. Ahora bien, este incremento debido a la adición de N al suelo, indicó que el nitrógeno necesario para el crecimiento vegetal no fue aportado a las plantas por la bacteria BFN17, como ya observado en el testigo inoculado. En general, para los cultivos hortícolas el factor limitante del rendimiento agrícola es la falta de N en el suelo (Aruani *et al.* 2008; Cerón y Aristizábal, 2012), y como lo señalan Vitousek *et al.*, (2010) y De Grazia *et al.* (2001), este último para la lechuga, la planta al no disponer de suficiente

studies reported that microorganism inoculations in commercial treatment promote nutrients assimilation by plants, such as yield increment in soybean and the fixation of N and P in grains as a response to different inoculants, which increased the nutrient absorption sites in the rhizosphere (Sandeep *et al.*, 2008). Here, it is likely that the lettuce's responses were mainly associated with N availability in the soil. Soil N availability might favor the metabolism of inoculated microorganism regarding to the production of phytohormones such as auxins, citoquinines, ethylene, gibberellins and abscisic acid (Ashraf *et al.*, 2013). It is important to note, according to the proposal by Valery and Reyes (2013), that the diverse responses obtained with inoculants under different natural conditions of soil and fertilization might depend upon different factors, among them are listed the presence of native microbial communities of rhizosphere, host, and inoculated microorganisms, which compete among them over root exudates and soil nutrients. Castellano-González *et al.* (2016) utilized sugarcane coir enriched with rock phosphate and inoculated with commercial microbial biofertilizers. (Azotofos, Biopack and Embrafos). Corn was grown in two Oxisol soil types. These researchers found that plant height, stem diameter and dry biomass were higher in Hapludox soil when enriched coir was applied unlike the non-enriched coir. This shows the effect of biofertilizer application on soil types and conditions of soil fertility.

N, teniendo suficiente P disponible, no puede construir más biomasa o tejido.

Estudios realizados por Valery y Reyes (2013), mencionan el efecto benéfico que los tratamientos con las cepas bacterianas, MFS y el consorcio MFS + MF1b (una cepa disolvente de fosfatos y la otra fijadora de nitrógeno de vida libre), tienen sobre la acumulación de peso seco del grano, y la eficiencia agronómica del maíz HIMECA-95, en relación al tratamiento no inoculado, bajo la condición de fertilización química con N y K. Asimismo, en otras investigaciones han reportado que la inoculación de microorganismos en tratamientos comerciales beneficia la asimilación de los nutrientes por la planta, observándose el incremento del rendimiento del cultivo de soya y la asimilación de N y P en los granos, bajo la utilización de diversos inoculantes, los cuales aumentarían los sitios de absorción de los nutrientes en la rizósfera (Sandeep *et al.*, 2008). Las respuestas que se obtuvieron con la lechuga en este trabajo, posiblemente dependieron mayormente de la disponibilidad del N en el suelo. Una disponibilidad de N en el suelo favorecerá posiblemente el metabolismo de los microorganismos inoculados en lo relativo a la producción de sustancias fitohormonales como auxinas, citoquininas, etileno, giberelinas, ácido abscísico (Ashraf *et al.*, 2013). Es importante destacar, según lo propuesto por Valery y Reyes (2013), que la variedad de respuestas que se obtienen con los inoculantes, bajo diferentes condiciones naturales del suelo y de fertilización, puede

On the other hand, table 2 shows that GL cultivar treated with 100N/RFSJN/100K + consortium experienced significant ($p < 0.05$) similarity compared with commercial treatment for all analyzed variables. Besides, leaf number and %P in foliar tissue showed 3% and 16.6% increase, respectively. On the contrary, BSS cultivar treated with inoculants did not show any significantly ($p < 0.05$) positive response compared with commercial treatment.

Regarding the %P foliar for GL cultivar (table 2), the addition of RFSJN to 100N/RFSJN/100K + consortium, resulted in similar performance to the one observed when commercial treatment was applied, this suggests that the P mineral source was mainly dissolved by the inoculated microorganisms, particularly the IRMF94 fungus via citric acid and glutonic acid production mechanisms, as it was reported by Reyes *et al.* (2001). In the same way, the RFSJN dissolution releases micro-nutrients that affects the activity of microbiota, which promotes the rhizospheric effect (Cuperus, 2016), by working as enzymatic activators of secondary metabolite production and phytohormones. These processes of rhizosphere enhance the nutritional properties of the crop, which improves the quality of non-conventional agriculture. Here, regarding the %P foliar obtained using 100N/RFSJN/100K + consortium and commercial treatments for GL cultivar was 0.35% and 0.45% for BSS cultivar, which are in the lowest values in the

depender de varios factores, entre ellos la presencia de las comunidades microbianas autóctonas de la rizósfera, la planta hospedadora, y los microorganismos inoculados, los cuales establecen competencia entre ellos por los exudados radicales de la planta, y los nutrientes del suelo. Asimismo, Castellanos-González *et al.*, (2016), usaron cachaza enriquecida con roca fosfórica inoculada con biofertilizantes microbianos comerciales (Azotofos, Biopack, Embrafos), y evaluaron el crecimiento del maíz en dos tipos de suelos Oxisoles; estos autores encontraron que en el suelo Hapludox se incrementaron los valores de altura de las plantas, diámetro del tallo y biomasa seca, con respecto a la cachaza no enriquecida, lo que muestra el efecto de la aplicación de los biofertilizantes sobre el tipo de suelos o condiciones de fertilidad de los mismos.

Por otra parte, en el cuadro 2 también se observa para la variedad GL con el tratamiento 100N/RFSJN/100K + consorcio, resultados significativamente ($p < 0,05$) similares en relación al tratamiento comercial para todas las variables analizadas. Además, el número de hojas y el %P foliar mostraron incrementos del 5% y 16,6% respectivamente. Contrariamente, los valores de las diferentes variables medidas para la variedad BSS y con los diferentes tratamientos inoculados, no mostraron ningún efecto positivo significativo ($p < 0,05$) respecto al tratamiento comercial.

En cuanto a la variable %P foliar para la variedad GL (cuadro 2), se

range (0.45-0.80%) reported by Jones *et al.* (1991), and IFA (1992), 0.48%, which were considered as adequate for lettuce. However, foliar P found in this study was higher than that reported by Sanchez *et al.* (2014), who obtained 0.11-0.22%P foliar for lettuce fertilized with rock phosphates e inoculated with RPCV, which are indeed low concentration for this crop. All this suggests that RFSJN as well as BFN17 and IRMF94 microorganisms could be used as environmentally friendly strategy for lettuce production. As an outstanding result of this research, it can be highlighted that the nutritional quality of BSS cultivar, related with phosphorous content, is higher than that found in GL cultivar, due to the higher foliar P content. Additionally, higher quantities of carbohydrates, P, Ca, Fe and vitamins have been reported for loose-leaf lettuce (BSS type) in comparison with iceberg or crisphead type (GL) (Vallejo and Estrada, 2004). Therefore, it must be considered that different cultivars of a crop, as in this lettuce case, do not have the same nutritional value, and their nutritional requirements must be different as well. This observation might explain, to a certain extent, why the BSS cultivar did not improve the measured parameters as a result of RFSJN and consortium inoculation as GL cultivar since its nutritional demand is higher. It is well known that the soil nutritional status affects the root exudate quality, and these exudates promote the expression of growth stimulating mechanisms of rhizobacteria. Perhaps, a higher dosage of RFSJN might supply the

puede observar que la utilización de la RFSJN en el tratamiento 100N/RFSJN/100K + consorcio, arrojó resultados muy similares al tratamiento comercial, lo que indicaría que esta fuente mineral de P fue principalmente disuelta por los microorganismos inoculados, probablemente por el hongo IRMF94 mediante los mecanismos de producción de ácido cítrico y ácido glucónico, como fue observado por Reyes *et al.* (2001). En este sentido, la disolución de la RFSJN libera microelementos que inciden en la actividad de la microbiota, lo que incentivaría el efecto rizosférico (Cuperus, 2016), al actuar como activadores enzimáticos en la producción de metabolitos secundarios y fitohormonas. Estos procesos de la rizósfera favorecen las propiedades nutricionales del cultivo, dándole así mayor calidad a la agricultura no convencional. En relación a los valores de %P foliar obtenidos en esta investigación con los tratamientos 100N/RFSJN/100K + consorcio y comercial, para la variedad GL fue de 0,35% y para la variedad BSS de 0,45%, los cuales se encuentran en el límite inferior al rango reportado por Jones *et al.* (1991), 0,45%-0,80%, y por IFA (1992), 0,48%, como concentraciones suficientes de P para lechugas. Sin embargo, el %P foliar obtenido en esta investigación es mayor que el reportado por Sánchez *et al.* (2014), quienes obtuvieron entre 0,11-0,20% de P foliar para la lechuga fertilizada con roca fosfórica e inoculada con RPCV, los cuales son valores bajos de contenido de P para este cultivo. Esto sugiere que, tanto

P demand of this cultivar, or other sources of phosphates since its quality also affects plant-microorganism interaction (Reyes *et al.*, 2001). Similarly, the lettuce genotype might have produced a natural variation in the root exudates and nutrient availability in the two lettuce cultivars. According to Jacoby *et al.* (2017), there is a strong evidence about the effect of plants on the microbiome structure due to the root exudates and adaptations developed by microbiota that allow them to thrive in the rhizospheric niche. This is not always the case, when exogenous microorganisms are introduced, such as bio-fertilizer applications, introduced microorganisms must adapt to the soil nutritional conditions, rhizosphere, and compete against native soil microorganisms.

The total phosphorous extraction by lettuce plants is shown in table 3, unlike BSS cultivar, GL cultivar under the treatment 100N/RFSJN/100K + consortium had a result significantly similar to the response caused by commercial treatment, with 2.9% increase total phosphorus extraction (% is obtained considering the phosphorus extracted by plants under commercial treatment). This response is explained owing to the rhizosphere effects of the two cultivars on the inoculated microorganisms. As abovementioned, the root exudate quality of each cultivar determines higher or lower rhizospheric effect of the inoculants. Singh and Mukerji (2006) and Jaboby *et al.* (2017) suggested a difference between primary or secondary root metabolites

la RFSJN como los microorganismos BFN17 e IRMF94, podrían utilizarse como una estrategia amigable con el ambiente para el cultivo de lechuga. Como un resultado atractivo de la presente investigación, se puede señalar que la calidad nutricional, en relación al contenido de P, de la variedad BSS es mayor con respecto a la variedad GL, debido al mayor %P foliar mostrado; adicionalmente, se ha reportado mayor cantidad de carbohidratos, P, Ca, Fe y vitaminas para las lechugas de hoja suelta (tipo BSS) en relación a las de cabeza (tipo GL) (Vallejo y Estrada, 2004); por esta razón se debe considerar que las variedades de un cultivo, en este caso la lechuga, no poseen el mismo contenido nutricional, y por lo tanto sus necesidades nutricionales también variarán. Esta observación podría explicar, al menos en parte, la razón por la cual la variedad BSS no se benefició en los parámetros medidos de la aplicación de la RFSJN y de la inoculación del consorcio, como la variedad GL, pues su demanda nutricional es superior. Es bien conocido que el estado nutricional del suelo incide en la calidad de los exudados radicales, y que éstos promueven la expresión de los mecanismos promotores de crecimiento en las rizobacterias. Posiblemente, una mayor dosis de RFSJN podría suplir las demandas de P de esta variedad, o inclusive otras fuentes de fosfatos, ya que su calidad también afecta las interrelaciones planta-microorganismos (Reyes *et al.* 2001). Asimismo, el genotipo vegetal pudo haber producido una variación

in the varieties of the same host species, such as it might be the case in GL and BSS cultivars. Thus, the rhizospheric effect of each cultivar due to nutritional differences might perhaps influence the microbiota and the plant-microorganism relationship, this suggests that the rhizosphere of each lettuce cultivar might module the plant growth promoting mechanisms of inoculated consortium through specific biological processes, for instance, IAA production, antibiosis, phosphate dissolution or biological fixation of nitrogen among other factors.

In this research, the treatment 100N/RFSJN/100K + consortium brought about 43,600 kg. ha⁻¹ for GL cultivar, which is higher than lettuce yield in Venezuela (19,942 kg. ha⁻¹) in 2007 according to the official report of Ministerio de Agricultura y Tierras (MAT) published in FEDEAGRO (2011).

Based on the results of this research, the consortium BFN17+IRMF94 is a promising inoculant for GL lettuce cultivar in soils with no P deficiency, or in combination with RFSJN as rock phosphates applied directly and inoculated with plant growth promoting microorganisms. It is necessary to understand the complex interactions among the different components of plant-soil-microorganism ecosystem to develop MDF that allows to substitute the strong acids utilized industrially to mobilize the P from rock phosphates (Antoun, 2012).

Finally, the sustainable agriculture development in Andean

natural en los exudados radicales y la disponibilidad de nutrientes de las dos variedades de la lechuga. De acuerdo a Jacoby *et al.* (2017), hay una clara evidencia que las plantas inciden en la estructura de los microbiomas, probablemente por los exudados radicales, y también por las adaptaciones desarrolladas por la microbiota, y que les permiten florecer en el nicho rizosférico. Este no es siempre el caso cuando se introducen microorganismos exógenos, como con la aplicación de los biofertilizantes, donde estos microorganismos introducidos tendrían que adaptarse a las condiciones nutricionales del suelo, al entorno rizosférico de planta, y además ser competitivos con los microorganismos autóctonos del suelo.

La extracción total de fósforo por las plantas de lechuga se muestra en el cuadro 3, en donde se puede observar que, a diferencia de la variedad BSS, la variedad GL con el tratamiento 100N/RFSJN/100K + consorcio presentó un valor estadísticamente ($p < 0,05$) similar al tratamiento comercial, con un incremento en 2,9% de la extracción total de fósforo por planta (el % se obtiene en relación al fósforo extraído por el tratamiento comercial). Este hecho puede explicarse por el efecto de la rizósfera de las dos variedades sobre los microorganismos inoculantes. Como ya se ha dicho, la calidad de los exudados radicales de cada variedad va a incidir en un mayor o menor efecto rizosférico de los inoculantes. Singh y Mukerji (2006) y Jacoby *et al.* (2017) señalan que podría haber una diferencia entre los metabolitos radicales primarios o secundarios

region of Venezuela must be based on the utilization of natural resources of the region such as the existing rock phosphate mines of San Joaquin de Navay, which is located at southeastern Tachira State.

Conclusions

The inoculated bio-substrate was an adequate transport agent for bio-fertilizer application. The two lettuce cultivars did not perform similar relationship with the inoculated microorganisms in field conditions. The GL lettuce cultivar, unlike BSS cultivar, bio-fertilized with the BFN17 + IRMF94 consortium and RFSJN application as P source and commercial N addition, showed similar results to those observed when commercial control was applied concerning variables of agronomic significance, which suggests to consider a substitution of chemical sources of soluble phosphate by sources of mineral phosphates or rock phosphates of low solubility. The direct RFSJN application and inoculated with biofertilizers such as the BFN17 + IRMF94 consortium for short cycle crops such as lettuce, might be a sustainable option for the development of an ecological horticulture.

Acknowledgement

Thanks are due to PEQUIVEN for providing the rock phosphates from San Joaquin de Navay, and the Bio-fertilizer, Soil and Bio-environmental laboratories of the UNET, and to the

Cuadro 3. Extracción total de fósforo en los tratamientos según las variedades de lechuga GL y BSS. Table 3. Total phosphorus extraction in GL and BSS lettuce cultivars treated with chemical and biological fertilizers.

Variedad	Extracción total de fósforo / planta / tratamiento (mg P total extraído)									
	0N/0P/100K no inoculado (Testigo absoluto)	0N/ RFSJN/ 100K no inoculado	0N/ RFSJN/ 100K + BFN17	0N/ RFSJN/ 100K + IRMF94	0N/ RFSJN/ 100K + consorcio (BFN17 + IRMF94)	100N/ RFSJN/100K + BFN17	100N/ RFSJN/100K + IRMF94	100N/ RFSJN/100K + consorcio (BFN17 + IRMF94)	100N/ RFSJN/100K + consorcio (BFN17 + IRMF94)	100N/100P/100K (Testigo comercial no inoculado)
GL	2,41	1,39	2,05	1,53	1,66	3,80	5,75	7,79	7,57	
	BCD	D	CD	D	D	ABC	AB	A	A	
BSS	1,68	0,93	0,54	1,21	0,81	4,99	4,62	3,23	12,85	
	bcd	de	e	cde	de	ab	abc	abc	a	

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de medias LSD a un nivel de confianza del 95%. Las letras mayúsculas hacen referencia a la prueba de medias de la variedad GL y las letras minúsculas de la variedad BSS. Tratamientos químicos: Testigo absoluto= 0N/0P/100K; testigo comercial no inoculado: 100N/100P/100K; testigo + biostrato (0N/

en relación a las variedades de una misma especie vegetal, como sería el caso de las variedades de lechuga GL y BSS. Por tanto, el efecto rizosférico de cada variedad, en razón de sus diferencias nutricionales, vendría a influir probablemente sobre la microbiota y la interrelación planta-microorganismos, lo cual sugiere que la rizósfera de cada variedad de lechuga estaría modulando los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal del consorcio inoculado mediante procesos biológicos específicos a la misma, como la producción de AIA, antibiosis, disolución de fosfatos o fijación biológica de nitrógeno, entre otros.

En esta investigación, con el tratamiento 100N/RFSJN/100K + consorcio se obtuvo un rendimiento de 43,600 kg.ha⁻¹ para la variedad GL, el cual fue superior a la producción reportada para la lechuga en Venezuela según cifras oficiales del Ministerio de Agricultura y Tierras (MAT) publicadas en FEDEAGRO (2011) para el año 2007 (19.942 kg.ha⁻¹).

Con base a los resultados de esta investigación, se podría considerar al consorcio BFN17+IRMF94 como un inoculante promisorio en el cultivo de la lechuga variedad GL en suelos sin deficiencias de P, o con la utilización de la RFSJN como mineral de fosfatos de aplicación directa e inoculado con microorganismos promotores del crecimiento vegetal. De esta manera, se deben entender las complejas interacciones entre los diferentes componentes del ecosistema planta-suelo-microorganismo, que permitan desarrollar MDF que puedan

staff of the Unidad Académica “La Primavera” de la UNET for their support. This research was financed by the Research Institute of the UNET.

End of English version

reemplazar los fuertes ácidos usados industrialmente para movilizar el P desde la roca fosfórica (Antoun, 2012).

Finalmente, el desarrollo de una agricultura sustentable en la región andina venezolana debe basarse en la utilización de los recursos naturales presentes como son los yacimientos de fosfatos minerales, siendo la mina de roca fosfórica de San Joaquín de Navay uno de ellos ubicado en el sureste del estado Táchira.

Conclusiones

El biosustrato inoculado fue un agente de transporte adecuado para la aplicación de los biofertilizantes. Las dos variedades de lechuga utilizadas no expresaron el mismo tipo de interacción con los inoculantes microbianos evaluados en el experimento de campo. La variedad GL, a diferencia de la variedad BSS, con la inoculación del consorcio BFN17 + IRMF94, y las aplicaciones de la RFSJN como fuente de P y la adición de N comercial, mostró valores equivalentes a los del testigo comercial en variables de importancia agronómica, lo que permitiría plantear la sustitución de fuentes químicas de fosfatos solubles por fuentes de

fosfatos minerales o rocas fosfóricas de baja solubilidad. La aplicación de la RFSJN en forma directa e inoculada con biofertilizantes, como el consorcio BFN17 + IRMF94 para cultivos de ciclo corto como la lechuga, puede ser una alternativa sustentable para el desarrollo de una agricultura hortícola ecológica.

Agradecimientos

El reconocimiento de los autores a la empresa PEQUIVEN por proveer la Roca Fosfórica de San Joaquín de Navay; a los laboratorios de Biofertilizantes, Suelos, y Bioambiental de la UNET, al personal encargado de la Unidad Académica “La Primavera” de la UNET, por todo el apoyo logístico, y al Decanato de Investigación de la UNET por el financiamiento otorgado.

Literatura citada

- Antoun, H. 2012. Beneficial Microorganisms for the Sustainable Use of Phosphates in Agriculture. *Procedia Engineering* 46: 62 – 67.
- Appleton, J.D. y A.J. Notholt. 2002. Local phosphate resources for sustainable development in Central and South America. British Geological Survey. Report CR/02/122/N. 96p.
- Aruani, M., P. Gili, L. Fernández, R. González-Junyent, P. Reeb, y E. Sánchez. 2008. Utilización del nitrógeno en diferentes manejos de fertilización en lechuga (*Lactuca sativa* L.) y su efecto sobre algunas variables biológicas del suelo, Neuquen – Argentina. *Agro sur* 36(3): 147-157.
- Ashraf, M.A., M. Asif, A. Zaheer, A. Malik, Q. Ali y M. Rasool. 2013. Plant growth promoting rhizobacteria and sustainable agriculture: A review. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7(9): 704-709.
- Barroso, C., G. Pereira y E. Nahas. 2006. Solubilization of CaHPO_4 and AlPO_4 by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. *Braz. J. Microbiol.* 37: 434-438.
- Barton, L.L. y D.E. Northup. 2011. *Microbial Ecology*. Wiley-Blackwell. USA. 448p.
- Blanco, E.L., M.E. Marquina y Y. Castro. 2013. Respuestas a la aplicación de carbamatos en dos aislados rizobianos provenientes de Mucuchíes, Estado Mérida, Venezuela. *Bioagro* 25(2): 117-128.
- Blanco, E.L. 2014. Evaluación del potencial biofertilizante de microorganismos en dos variedades de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al Título de Magister en Agronomía, mención Producción Vegetal. Decanato de Postgrado. Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET). San Cristóbal, Venezuela. 116p.
- Castellanos González, L., R. de Mello Prado., G. Caione, L. Rosatto Moda., L.C. Asis., E. Nahas., E. Parets Selva, e H.J. de Almeida. 2016. Efecto de la cachaza más roca fosfatada enriquecida con microorganismos sobre la disponibilidad, absorción de P y el crecimiento del maíz en dos tipos de suelo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 33: 1-18.
- Cerón, L. y F. Aristizábal. 2012. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14(1): 285-295.
- Cuperus, F. 2016. An explorative case study on soil micronutrient availability in the province Groningen, The Netherlands. MSc thesis Farming Systems Ecology chair group. The Netherlands. 105p.
- De Grazia, J., P.A. Tiftonell, y A. Chiesa. 2001. Efecto de la época de siembra, radiación y nutrición nitrogenada sobre el patrón de crecimiento y el rendimiento del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Invest. Agr. Prod. Prot. Ve.* 16(3):355-365.

- De Oliveira, J.J., G.O. Dalmazo, T.B. Gamboa Araujo Morselli, V.F. da Silva de Oliveira, L.B. Corrêa, L. Nora, É.K. Corrêa. 2018. Composted slaughterhouse sludge as a substitute for chemical fertilizers in the cultures of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and radish (*Raphanus sativus* L.). Food Sci. Technol., Campinas, 38(1): 91-97.
- FAO. 2007. Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/y5053s/y5053s00.html>. Fecha de consulta: julio 2012.
- FEDEAGRO. 2011. Disponible en: <http://www.fedeagro.org/produccion/Rubros.asp>. Fecha de consulta: marzo 2011.
- Hwangbo, H., R. Park, Y. Kim, Y. Rim, K. Park, T. Kim, J. Suh y K. Kim. 2003. 2-Ketogluconic Acid Production and Phosphate Solubilization by *Enterobacter intermedium*. Curr. Microbiol. 47(2): 87-92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506853>. Fecha de consulta: septiembre 2013.
- IFA. 1992. World fertilizer use manual. Disponible en: <http://www.fertilizer.org/ifa/Home-Page/LIBRARY/Our-selection2/World-Fertilizer-Use-Manual/by-type-of-crops>. Fecha de consulta: marzo 2011
- Jacoby, R., M. Peukert, A. Succurro, A. Koprivova, y S. Kopriva. 2017. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. Front. Plant Sci. 8: 1617.
- Jones, B., B. Wolf y H. Mills. 1991. Plant analysis handbook: a practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. Georgia: Micro-Macro Publishing. USA. 213p.
- Kumar, S. y P. Dey. 2011. Effects of different mulches and irrigation methods on root growth, nutrient uptake, water-use efficiency and yield of strawberry. Scientia Horticulturae, 127: 318-324.
- Madigan M., J. Martinko, J. Parker. 2003. Brock Biología de los microorganismos. 10^o ed. Editorial Prentice Hall. Madrid, España. 1089p.
- Montgomery, D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Editorial Iberoamericana. 541 p.
- Reyes, I., L. Bernier, R. Simard, y H. Antoun. 1999a. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. FEMS Microbiol. Ecol. 28: 281-290.
- Reyes, I., L. Bernier, R. Simard, P. Tanguay, y H. Antoun. 1999b. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. FEMS Microbiol. Ecol. 28: 291-295.
- Reyes, I., R. Baziramakenga, L. Bernier y Antoun H. 2001. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. Soil Biol. Biochem. 33:1741-1747.
- Reyes, I., A. Valery y Z. Valduz. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. Plant and Soil 287: 69-75.
- Salas, A. 1989. Algunos parámetros relacionados con la reactividad de las rocas fosfóricas de Navay y Monte Fresco en el estado Táchira. FOSFASUROESTE. San Cristóbal, Venezuela. 23 p.
- Sánchez, D.B., A.M. García, F.A. Romero, R.R. B. 2014. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Rev. Colomb. Biotecnol. 16(2): 122-128.
- Sandeep, A. R., Stephen J. y Jisha M.S. 2008. Yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max* (L) Merr) as influenced by phosphate solubilizing microorganisms. World J. Agric. Sci. 4(S): 835-838.
- Sarker, A., Md. A. Kashem, K.T. Osman, I. Hossain, F. Ahmed. 2014. Evaluation of Available Phosphorus by Soil Test Methods in an Acidic Soil Incubated with Different Levels of Lime and Phosphorus. OJSS. 4: 103-108.

- Silva, F. 1988. Fertilidad de suelos. 3ra ed. Bogotá, Colombia. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. 473 p.
- Singh, G. y K. Mukerji. 2006. Root Exudates as Determinant of Rhizospheric Microbial Biodiversity. In: Microbial Activity in the Rhizosphere. Mukerji K.G., Manoharachary C. y Singh J. Soil Biology. 7. pp 39-53.
- Valery, A. e I. Reyes. 2013. Evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento bajo diferentes esquemas de fertilización en el cultivo de maíz variedad HIMECA-95. Rev. Colomb. Biotecnol. 15(2): 81-88.
- Vallejo, F. y E. Estrada. 2004. Producción de hortalizas de clima cálido. Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira. 345p.
- Vessey, J. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil. 255: 571-586.
- Vitousek, P.M., S. Porder, B.Z. Houlton, y O.A. Chadwick. 2010. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. Ecol. Appl. 20(1): 5-15.
- Zagal, E. 2005. El Ciclo del Nitrógeno en el suelo. Ciencia Ahora. 16: 103-110. Disponible en: <http://es.scribd.com/8012/14ElCicloDelNitrogeno>. Fecha de consulta: enero 2014.