

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad



**Evaluación de *Bacillus cereus* como  
mejorador del crecimiento de plantas de  
banano (*Musa AAA*) bajo condiciones de  
ambiente protegido.**

**Estudiante:**

**Rodya Mauricio Ortega Bonilla**

**Tutora**

**Dra. Lidieth Uribe L.**

**2023**

Instituto Tecnológico de Costa Rica



Eje temático Sistemas de Producción Sostenible

Tesis de Maestría

**Evaluación de *Bacillus cereus* como mejorador del crecimiento de plantas de banano (*Musa AAA*) bajo condiciones de ambiente protegido**

Rodya Mauricio Ortega Bonilla



Dr. Lidieth Uribe L.

Director de Tesis



Dr. Fabián Echeverría B.

Asesor de Tesis

Santa Clara, Costa Rica

TEC | Tecnológico  
de Costa Rica

UNA  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
COSTA RICA

**Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad**

**Eje temático de Sistemas de Producción Sostenible**

Evaluación de *Bacillus cereus* como mejorador del crecimiento de plantas de  
banano (*Musa AAA*) bajo condiciones de ambiente protegido

Trabajo sometido a consideración del Tribunal Evaluador como requisito para optar por el  
grado de Magister Scientiae en Ciencia y Tecnología Sostenible, bajo el eje temático de  
Sistemas de producción sostenible

Dra. Ingrid Varela Benavides

En representación del coordinador del DOCINADE



Dr. Jose Pablo Jiménez Madrigal

Gestor de la Maestría



Dra. Lidieth Uribe Lorío

Directora de tesis



Dr. Fabián Echeverría Beirute  
Miembro del Comité Asesor de Tesis



Dr. Edwin Esquivel Segura  
Representante del área temática

Julio, 2023

## **Agradecimientos**

A la Corporación Bananera Nacional (CORBANA) por el apoyo financiero recibido y por las facilidades para la realización de esta investigación a través de Junta Directiva, Gerencia General y Subgerencias.

Al Dr. Rafael Segura Mena, por el apoyo brindado para la consecución de esta meta.

A la Dra. Lidieth Uribe Lorío, por su dirección y el compartir su experiencia en el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Fabián Echeverría Beirute, por todos sus muy atinadas recomendaciones, consejos y colaboración realizada durante esta investigación.

Al M Sc. Pedro Torres Asuaje, por toda la ayuda y colaboración recibida durante la elaboración de este documento.

Al Ing. Miguel González por la dirección y consejos en el desarrollo de este proyecto y demás compañeros de la Sección de Agrofisiología – Clima-Producción por la ayuda brindada.

A la M Sc. Claudiana Carr, Juan C. Retana y Gabriel Vega del laboratorio de Control Biológico.

A la M Sc. Ana M. Conejo por su ayuda en la identificación de los aislamientos.

A Don Fabio Blanco por su ayuda en el análisis estadístico y consejos para la realización de este proyecto.

Al programa de Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad, por permitirme ser parte de esta primera generación y a sus profesores por la grata experiencia y el aprendizaje alcanzado.

## **Dedicatoria**

A Dios quien me ha dado todo y que me ha permitido realizar esta meta como tantas otras.

Para mi familia, Juliana mi esposa e hijas Denisse y Victoria quienes son la fuente de mis mayores alegrías y completan mi vida. A mi padre Gerardo q.D.g. no pudo estar en la graduación, me hubiera encantado que me acompañara, a mi hermano Marvin, mi mamá q.D.g., mi tía Daysi, mis primas/hermanas Dayla y Sandra.

## Declaración de autenticidad

“Mediante el presente documento, yo Rodya Mauricio Ortega Bonilla, identificado con documento de identidad n° 108900928, declaro que la tesis presentada con título “Evaluación de *Bacillus cereus* como mejorador del crecimiento de plantas de banano (*Musa AAA*) bajo condiciones de ambiente protegido”, para optar por el Grado Académico de Magister Scientiae en Ciencia y Tecnología Sostenible bajo el eje temático de *Sistemas de producción sostenible*, ha sido desarrollada íntegramente por el autor que lo suscribe y afirmó que no existe plagio de ninguna naturaleza. Así mismo, dejo constancia de que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en la tesis, por lo que no se ha asumido como propias las ideas emitidas por terceros, Así mismo, afirmo que soy responsable de todo su contenido y asumo, como autor, las consecuencias ante cualquier falta, error u omisión de referencias en el documento. Sé que este compromiso de autenticidad y no plagio puede tener connotaciones éticas y legales. Por ello, en caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a lo dispuesto en las normas académicas que dictaminen las Universidades participantes de este programa doctoral.”



Rodya Ortega Bonilla.

## Tabla de Contenidos

Agradecimientos.....	i
Dedicatoria .....	ii
Declaración de autenticidad .....	iii
Indice de figuras .....	¡Error! Marcador no definido.
Indice de tablas.....	vii
Resumen .....	ix
Abstract .....	x
1. Introducción .....	1
2. Objetivos .....	11
3. Síntesis.....	11
4. Artículo 1 .....	13
Introducción.....	15
Materiales y métodos .....	17
Resultados .....	23
Discusión .....	35
Conclusiones .....	38
Agradecimientos.....	39
Referencias .....	39
5. Artículo 2.....	45
Introducción.....	46
Materiales y métodos .....	48
Resultados .....	54
Discusión .....	622
Conclusiones .....	64
6. Discusión Global.....	68

7. Conclusiones globales:.....	72
8. Recomendaciones .....	73
9. Referencias. ....	744

## Índice de figuras

Figura 1. Peso seco total de plántulas de banano ( <i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish) inoculadas con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i> en combinación con cuatro dosis de nitrógeno semanal y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. Barras con una misma letra no son significativamente diferentes (N=10, Tukey, $p>0,05$ ).....	28
Figura 2. Peso seco de plántulas de banano ( <i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish) inoculadas con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i> , en combinación con cuatro dosis de nitrógeno semanal y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. Barras con una misma letra no son significativamente diferentes (N=10; Tukey, $p>0,05$ ). ....	29
Figura 1. Medias del contenido de fósforo, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano ( <i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i> , y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.....	55
Figura 2. Medias del contenido de potasio, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano ( <i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i> , y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.....	56
Figura 3. Medias del contenido de zinc, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo	



de plántulas de banano ( <i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i> , y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.....	57
Figura 4. Medias del contenido de azufre, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano ( <i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i> , y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.....	58
Figura 5. Medias del contenido de fósforo, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano ( <i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i> , y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.....	59
Figura 6. Medias del contenido de potasio, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano ( <i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i> , y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.....	60
Figura 7. Medias del contenido de azufre, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano ( <i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i> , y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.....	61
Figura 8. Medias del contenido de zinc, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano ( <i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i> , y como sustrato un suelo de la zona	

oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020..... 62

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Propiedades químicas y físicas de los suelos utilizados en dos experimentos provenientes de las zonas este y oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. .... 18

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos utilizados en la evaluación de cuatro aislamientos de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento y el contenido de nitrógeno de plántulas de banano (*Musa AAA*) en condiciones de invernadero. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. .... 21

Cuadro 3. Medias, análisis de contrastes y estudio de tendencia lineal para la altura de planta, índice de área foliar (IAF) y contenido de clorofila, de plántulas de banano (*Musa AAA* cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculadas con aislamientos de *Bacillus cereus* en combinación con cuatro dosis de nitrógeno semanal, y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. .... 24

Cuadro 4. Medias, análisis de contrastes y estudio de la tendencia lineal para la altura de planta, índice de área foliar (IAF) y contenido de clorofila, de plántulas de banano (*Musa AAA* cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculadas con aislamientos de *Bacillus cereus* en combinación con cuatro dosis de nitrógeno semanal, y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. .... 25

Cuadro 5. Análisis de contrastes del efecto de nitrógeno y estudio de tendencia lineal para el peso seco total de plántulas de banano (*Musa AAA* cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish) inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, utilizando como sustrato suelo proveniente de las zonas este y oeste de producción. Corporación Bananera Nacional (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. .... 277

<b>Cuadro 6. Medias del contenido de nitrógeno, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno y estudio de la tendencia lineal para las hojas y el pseudotallo de plántulas de banano (<i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish) inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i>, y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. ....</b>	<b>31</b>
<b>Cuadro 7. Medias del contenido de nitrógeno, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno y estudio de tendencia lineal para la raíces y cormo de plántulas de banano (<i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish) inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i>, y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. ....</b>	<b>32</b>
<b>Cuadro 8. Medias del contenido de nitrógeno, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el pseudotallo de plántulas de banano (<i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i>, y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. ....</b>	<b>33</b>
<b>Cuadro 9. Medias del contenido de nitrógeno, contrastes ortogonales, análisis del efecto del nitrógeno y el estudio de tendencia lineal para las raíces y el cormo de las plántulas de banano (<i>Musa</i> AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de <i>Bacillus cereus</i>, y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica. Año 2020. ....</b>	<b>355</b>
<b>Cuadro 1. Propiedades químicas y físicas de los suelos utilizados en dos experimentos provenientes de las zonas este y oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. ....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Cuadro 2. Descripción de los tratamientos utilizados en la evaluación de dos aislamientos de <i>Bacillus cereus</i> el contenido de potasio, fósforo, azufre y zinc en plántulas de banano (<i>Musa</i> AAA) bajo condiciones de invernadero. Los tratamientos se utilizaron en ambos experimentos. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. ....</b>	<b>522</b>

## Resumen

Se realizaron dos experimentos en forma simultánea con el objetivo de evaluar el efecto de la inoculación de cuatro aislamientos de *Bacillus cereus*: BF-98, SER-23, B-71 y SER-217, sobre el crecimiento y el contenido de nitrógeno (N) de plántulas de banano en condiciones de invernadero. Se realizaron tres inoculaciones cada 21 días de los aislamientos. Como planta indicadora se utilizó plántulas de banano (*Musa* AAA variedad Gran Enano) a las cuales se les fertilizó con cuatro dosis de nitrógeno de forma semanal. Se utilizó un diseño de parcela dividida, donde la parcela principal estuvo conformada por cuatro niveles de N: 0, 33, 66 y 100% de la dosis; y la parcela pequeña por los aislamientos bacterianos y el testigo. Se midieron las variables altura de planta, contenido de clorofila, el área foliar de la tercera hoja, peso fresco y seco de raíces, cormo, pseudotallo y hojas, así como el contenido de nitrógeno en cada órgano. El experimento N°1 se realizó en un suelo proveniente de la zona ubicada al este del río Reventazón. El experimento N°2 utilizó un suelo proveniente de la zona ubicada en el oeste del río Reventazón. Para la zona este, el mayor peso seco total se alcanzó en la aplicación de SER-23, mientras que para SER-23 y BF-98 se observó el incremento del Zn en pseudotallos y hojas ( $P \leq 0,0313$ ) y el incremento en el contenido de K y S en los pseudotallos ( $P \leq 0,0126$ ,  $P \leq 0,0386$  respectivamente). En la zona oeste, con la cepa BF-98 se presentó el aumento del peso seco total y se observó el aumento del contenido de K ( $P \leq 0,0190$ ) en los pseudotallos. En los aislamientos BF-98 y SER-23 para ambas zonas ocurrió un aumento significativo del contenido de nitrógeno en los órganos evaluados. El uso de una dosis mayor al 33% de nitrógeno y el tipo de suelo, afectó la capacidad de las bacterias de incrementar la concentración de los nutrientes en los pseudotallos y hojas. Se concluye que la inoculación de los aislamientos SER-23 y BF-98 estimuló el aumento de la biomasa y contenido de N, K, Zn y S en las plantas de banano, este incremento dependió de la disponibilidad de nitrógeno y el tipo de suelo.

## Palabras claves

Bacterias; promoción de crecimiento; banano; absorción de elementos; nutrición alternativa.

## Abstract

Two experiments were carried out simultaneously with the objective of evaluating the effect of the inoculation of four isolates of *Bacillus cereus*: BF-98, SER-23, B-71 and SER-217, on growth and nitrogen content (N) of banana seedlings under greenhouse conditions. Three inoculations of the isolates were made every 21 days. Banana seedlings (*Musa* AAA variety Gran Enano) were used as indicator plants, which were fertilized with four doses of nitrogen weekly. A split plot design was used, where the main plot was made up of four levels of N: 0, 33, 66, 100% of the dose; and the small plot for the bacterial isolates and the control. The variables plant height, chlorophyll content, leaf area of the third leaf and dry weight of roots, corm, pseudostem and leaves, as well as the nitrogen content in each organ, were measured. Experiment No. 1 was carried out on soil from the area located east of the Reventazón river. Experiment No. 2 used soil from the area located to the west of the Reventazón river. For the eastern zone, the highest total dry weight was reached in the application of SER-23, while for SER-23 and BF-98 the increase of Zn in pseudostems and leaves was observed ( $P \leq 0.0313$ ) and the increase in the content of K and S in the pseudostems ( $P \leq 0.0126$ ,  $P \leq 0.0386$  respectively). In the western zone, in strain BF-98, the increase in total dry weight was determined and the increase in K content ( $P \leq 0.0190$ ) in the pseudostems was observed. In isolates BF-98 and SER-23, for both zones, a significant increase in nitrogen content occurred in the evaluated organs. A dose greater than 33% of nitrogen and the type of soil affected the ability of the bacteria to increase the concentration of nutrients in the pseudostems and leaves. It is concluded that the inoculation of the isolates SER-23 and BF-98 stimulated the increase in biomass and content of N, K, Zn and S in banana plants, this increase depended on the availability of nitrogen and the type of soil.

## Keywords

bacteria; growth promotion; banana; absorption of elements; alternative nutrition.

# 1. Introducción

## 1.1 El objeto de estudio:

En la actualidad existe una constante preocupación por el cambio climático y el impacto de nuestras acciones sobre el planeta. Un ejemplo de esto es la agricultura la cual utiliza agroquímicos para la producción de alimentos y el manejo de: plagas, enfermedades, arvenses y la nutrición del cultivo. En muchos países, la mayor fuente de contaminación del agua es la agricultura no las ciudades o la industria. A nivel mundial el contaminante químico más común en los acuíferos subterráneos son los nitratos procedentes de la actividad agrícola (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2018).

Algunas bacterias que viven en la rizosfera tienen propiedades como la fijación biológica de nitrógeno y la promoción de crecimiento. Se considera que la utilización de estas bacterias puede ser una opción viable para disminuir el uso de agroquímicos los cuales tienen un efecto sobre el ambiente y la inocuidad de los alimentos y agua (Chauhan et al., 2015).

El uso de estas bacterias en el cultivo de banano (*Musa AAA*) ha sido poco estudiado. Su utilización podría permitir la reducción en la aplicación de insumos sintéticos y fertilizantes. El reducir el uso de estos insumos y de forma paralela, sus efectos en el ambiente se considera un efecto positivo en el mediano y largo plazo. Para esta investigación se ha definido como objeto de estudio, evaluar el efecto de la aplicación de cuatro aislamientos de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento de plantas de banano en condiciones controladas.

## 1.2 Las preguntas de investigación:

Las preguntas de la investigación nos permiten realizar el planteamiento del problema que se va a estudiar, acercarnos al objeto de estudio y mantener el enfoque en él. Su construcción y desarrollo nos permite resolver las inquietudes que lo comprenden facilitando su estudio al dividirlo en diferentes etapas. A continuación, se enuncia la primera pregunta:

A. ¿La aplicación de los aislamientos de *Bacillus cereus* SER-217, SER-23, B-71, BF-98 causan algún impacto sobre el crecimiento de plantas de banano (*Musa AAA*)?

La respuesta a la primera pregunta nos permite determinar si los aislamientos bacterianos utilizados pueden promover el desarrollo de las plantas en etapas iniciales de

crecimiento. El determinar la capacidad de los aislamientos para mejorar el crecimiento, hace a esta pregunta la más importante de todas. Al mismo tiempo permite avanzar hacia la siguiente etapa en la investigación al facilitar el desarrollo de las siguientes preguntas. La segunda pregunta se muestra a continuación:

B. ¿Variaciones en la condición del sustrato de crecimiento para el establecimiento de los aislamientos de *B. cereus* tales como el contenido de nitrógeno disponible o las condiciones químicas, físicas del suelo, afectan la expresión o la actividad de las cepas SER-217, SER-23, B-71, BF-98?

La información generada durante el desarrollo de investigación permite determinar si variables previamente contempladas son también factores determinantes para las propiedades de los aislamientos estudiados. La pregunta dos permite responder la hipótesis sobre la afectación de la capacidad de las bacterias para promocionar el crecimiento como consecuencia de la disponibilidad de nitrógeno en el medio de crecimiento. No se tiene información sobre el efecto que puedan causar pequeñas variaciones en la condición química o la textura del suelo sobre los aislamientos. Los datos generados permiten desarrollar la información necesaria para responder estas interrogantes.

La tercera pregunta se presenta a continuación:

C-¿La aplicación de los aislamientos SER-217, SER-23, B-71, BF-98 puede afectar la absorción de nutrientes como fósforo, potasio, azufre y zinc en las plantas de banano?

La última de las preguntas es realizada sobre la evidencia de que aislamientos bacterianos pueden promover la absorción de elementos. Se ha reportado en otros cultivos la capacidad de aumentar la absorción de elementos como azufre, fósforo, zinc y potasio estos asociados a la fracción orgánica del suelo. Poder comprobar este efecto de los aislamientos estudiados podría significar un aporte complementario a la nutrición. Al ser capaz la bacteria de solubilizar nutrientes fijados, se traduce a largo plazo en un aporte de nutrientes y un considerable ahorro de dinero. Esto cobra importancia ante la escasez de fertilizantes que sufre el mundo producto del conflicto entre Rusia y Ucrania.

Las hipótesis son respuestas tentativas al problema investigado y a las preguntas de la investigación. A través de ellas surgen las primeras respuestas ante las preguntas de la investigación. Como hipótesis de la investigación se propuso: "Los aislamientos bacterianos SER-217, SER-23, B-71, BF-98 del género *B. cereus* en condiciones controladas tienen la capacidad de ser utilizadas como bacterias promotoras del

crecimiento de plantas de banano (*Musa AAA*) siendo una alternativa para disminuir el aporte de fertilizante nitrogenado al cultivo y proveer al suelo microorganismos benéficos y diversidad de organismos”.

## **1.3 Marco teórico**

### **1.3.1 La sostenibilidad de nuestro mundo**

Hoy en día, la sostenibilidad de nuestras actividades debe ser la principal de nuestras preocupaciones y de nuestras obligaciones. Lentamente se está creando una conciencia colectiva sobre los efectos de nuestras acciones en el ambiente y sus consecuencias en el largo plazo. El proceso para lograr el cambio ha iniciado y el presente trabajo de investigación es un ejemplo de tecnologías existentes que se deberán incorporar en las actividades que realizamos a diario.

La sostenibilidad involucra varias dimensiones que dada su codependencia en ocasiones es difícil separarlas. Por ejemplo, la afectación de los servicios ecosistémicos incluye asuntos como la inocuidad del agua dulce, la contaminación del aire y del suelo, así como la salud y calidad de este. Paralelamente a estas cuestiones surge la preocupación por otros temas relacionados como la contaminación de los mares y la afectación de la vida acuática, la inocuidad de los alimentos y seguridad alimentaria.

Estos asuntos están vinculados directamente con la salud de la humanidad siendo evidente que no se puede lograr crecimiento económico y social sin sostenibilidad. Unida a esta, la otra gran preocupación es el cambio climático y las implicaciones que este causará alterando los niveles de los océanos y provocando fenómenos climáticos extremos. Es claro que solo trabajando juntos los países y sus sociedades se puede lograr un nuevo camino para lograr un bien común y evitar las desigualdades (Naciones Unidas, 2023).

Al mismo tiempo que el ambiente mantiene gran relevancia para la ciencia, la necesidad de alimentar a una población cada vez más creciente continúa siendo uno de los objetivos globales pendientes de lograr. Los conflictos armados, el cambio climático y las crisis económicas son los responsables del hambre severa de 135 millones de personas en países vulnerables a sufrir escasez de alimentos (Naciones Unidas, 2023). La tecnología actual debe buscar alternativas para la producción eficiente de alimentos.



### **1.3.2 La producción de alimentos y la agricultura actual**

Las tendencias de crecimiento de la población mundial predicen que esta seguirá en aumento y alcanzará una suma de 10 mil millones de personas para el año 2050 (Suzuki, 2019). Esto significará un enorme desafío para la agricultura la cual tendrá que proveer de alimentos a una población en constante crecimiento. Para alimentar a una población de 9 mil millones de personas, la producción de alimentos deberá incrementarse entre los años 2020 y 2050 en un 70% (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2009).

La producción de alimentos no crecerá a un ritmo que permita satisfacer la creciente demanda poblacional. Siendo la búsqueda de nuevas tierras y la disponibilidad de agua factores fundamentales para lograr este aumento, la demanda de nuevas áreas de producción supondrá una mayor presión sobre los sistemas agroambientales. Sin embargo, las tierras disponibles no son las más aptas para alcanzar esta producción (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2009).

El aumento de los rendimientos en los sistemas agrícolas en los países en desarrollo alcanzado en las décadas sesenta y setenta se basó en la modificación del ambiente de manera que se crearan mejores condiciones para la agricultura y la ganadería que las condiciones existentes. Ejemplo de esto son: el regadío, la aplicación constante de sales concentradas fertilizantes, el empleo de agroquímicos para el control de plagas y arvenses, el uso de vacunas y medicamentos, la mecanización del suelo, la utilización de combustibles fósiles y variedades mejoradas genéticamente. Este cambio en la manera de explotar los sistemas agroalimentarios es conocido como Revolución Verde (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1996).

La agricultura intensiva creada por la Revolución Verde puede causar impactos en el ambiente, ejemplo de esto es la aplicación de fertilizantes de origen sintético los cuales pueden acidificar el suelo, ocasionar la pérdida o lavado de nutrientes como calcio, magnesio, el incremento de nitratos los cuales son contaminantes de las fuentes de agua, especialmente en los pozos de extracción para consumo humano (Altieri et al., 2015; Khatoon et al., 2020; Nicholls et al., 2017). La aplicación de fertilizantes nitrogenados causa la liberación de óxido nitroso, un gas cuya capacidad de absorber y emitir radiación infrarroja es 300 veces mayor que el dióxido de carbono equivalente, lo que corresponde con el 6,2%

del total de emisiones gases efecto invernadero (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015).

El incremento de los rendimientos productivos necesarios para satisfacer las necesidades de alimento para las próximas generaciones no puede estar basado en las técnicas de producción en las que está fundamentada la revolución verde. La agricultura moderna debe basarse en técnicas e insumos que sean sostenibles y que disminuyan el impacto de las actividades que realizan los sistemas agrícolas.

### **1.3.3 El género *Musa* y sus muchas especies**

Las especies que comúnmente conocemos como plátanos y bananos se clasifican en el orden Zingiberales, familia Musaceae la cual incluye tres géneros (*Musa*, *Ensete*, *Musella*) (Martínez et al., 2012). Una significativa cantidad de especies que pertenecen al género *Musa* conforman la base de la alimentación de una gran cantidad de personas en diversos países convirtiendo a este cultivo en uno de los más importantes en el trópico y subtropico (Sun et al., 2018). Ejemplo de esto es el comercio mundial de banano (*Musa* AAA) sin incluir al plátano, que alcanzó según estimaciones 18,1 millones de toneladas en el año 2017 (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2018).

### **1.3.4 El cultivo de banano en Costa Rica**

La historia de este cultivo en Costa Rica inicia con la construcción del ferrocarril. La idea original de la construcción fue crear una vía de comunicación que permitiera el transporte del café producido en el valle central hacia el puerto de Limón. Sin embargo, la cosecha de café es estacional y el ferrocarril debía emplearse en el traslado de otros productos durante el período en el cual no ocurría cosecha de este. La producción de banano inicia cerca del año de 1872, las tierras de cultivo fueron dadas a la compañía constructora del ferrocarril como pago por la obra. Así es como las primeras plantaciones nacen en los terrenos contiguos a la línea del tren (Soto, 2014).

La implementación de los principios de la revolución verde permitió que el país mantuviera durante muchos años los mayores rendimientos del continente por superficie de siembra (Soto, 2014). En la actualidad la comercialización de esta fruta en el sector de exportaciones representa divisas por más de USD \$900 millones de dólares anuales siendo el primer lugar del producto interno bruto agrícola del país generando 42 mil empleos directos. La industria del banano representa el principal ingreso económico para casi 400

mil personas que están relacionadas de una u otra forma a esta actividad económica (Corporación Bananera Nacional, 2021).

### **1.3.5 Las amenazas sobre la producción de bananos**

El modelo actual de producción de alimentos está puesto a prueba. La información sobre los efectos en el ambiente, la salud humana, el cambio climático, la seguridad alimentaria es una advertencia sobre la necesidad de cambios o ajustes importantes. El compromiso de disminuir nuestros impactos en el ambiente hace que exista una necesidad cada vez mayor de transformación de los sistemas agroalimentarios actuales.

La difusión de informaciones que relacionan sustancias utilizadas en la agricultura con efectos nocivos sobre la salud humana o de especies como las abejas, es cada vez más común. Muchos de estos ingredientes activos poseen un período prolongado de uso, siendo su persistencia y consecuencias en el ambiente desconocidos. Esto ha provocado la preocupación por la inocuidad de los alimentos, causando la acción por parte de algunos gobiernos e instituciones vinculadas. Prueba de esto, es la discusión actual de una iniciativa conocida como “del campo al tenedor”, por parte del Pacto Verde de la Unión Europea el cual tiene como objetivo disminuir en un 50% el uso de agroquímicos y fertilizantes (Comisión Europea, 2023; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2021; United States International Trade Commission, 2020). La finalidad de esta iniciativa es limitar el acceso de productos que incumplan esta condición.

En relación con este tema, el cultivo de banano aplica más de 300 kg ha año<sup>-1</sup> de nitrógeno como fertilizante, cuya eficiencia en los trópicos es cercana al 50% (Robinson, & Galán Saúco, 2012). La iniciativa europea representa la disminución del 50% en el uso de estos fertilizantes, la deficiencia de este nutriente provocaría la disminución de los rendimientos del cultivo. Existe una inquietud creciente ya que no se cuenta con alternativas de sustitución que permitan mantener niveles productivos similares y que no causen el aumento de los costos de operación.

Situación similar sucede con los límites máximos de residuos (Imr) de plaguicidas, el comité del Codex sobre residuos de plaguicidas (CCPR por sus siglas en inglés) mantienen una revisión constante de ingredientes activos ya sea por período de tiempo o por ser compuestos de preocupación a la salud. Muchos de estos ingredientes activos están cerca de su salida o tienen bajos Imr (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2023).

Para el cultivo a nivel nacional existen una serie de amenazas tales como: producción irregular, alteraciones en la calidad del fruto, nuevas plagas, el ingreso de enfermedades exóticas, altos costos productivos y barreras no arancelarias. En este sentido el manejo intensivo que se implementa no parece estar disminuyendo la incidencia de estas amenazas. Por el contrario, la aplicación constante de agroquímicos podría favorecer o acelerar la incidencia de algunas de estas amenazas.

En correspondencia con lo indicado, la mayoría de las fincas para mantener un control aceptable de las poblaciones del nematodo barrenador (*Radopholus similis*) y el picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) requiere de la aplicación regular de nematicidas – insecticidas químicos. Otro ejemplo es el control de enfermedades fungosas como la Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*) necesitando del uso constante de fungicidas. A pesar de este esfuerzo esta epifitía mantiene una coexistencia permanente.

Algunos autores (Pattison et al., 2005; Rosales et al., 2007; Segura et al., 2015) han citado a las técnicas de producción de la revolución Verde tales como la utilización constante de agroquímicos, la fertilización intensiva, la alta densidad de plantas y la ausencia de cobertura del suelo como factores que afectan la salud y la calidad de los suelos. Esta afectación ocurre en un plazo relativamente corto para las actividades humanas causando el deterioro del suelo y la sostenibilidad de los servicios que estos prestan provocando el decline progresivo de la producción y la resiliencia del cultivo.

En acuerdo con esta afirmación en el Caribe de Costa Rica se relacionó la abundancia de raíz funcional de las plantas y la productividad medida como la cantidad de cajas de fruta (peso de caja 18,14 kg) por área de siembra. Se determinó que al ocurrir una disminución de 10 gramos de raíz funcional se presentaba un descenso en la productividad de 88,5 cajas ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Serrano, 2005). Esto permitió concluir que las condiciones de suelo (acidificación, drenaje, erosión, manejo nutricional, microbiota, entre otros) afectan la raíz del cultivo lo cual disminuye su capacidad para mantener altos rendimientos productivos.

Continuando con las amenazas que enfrenta el productor de banano en Costa Rica se encuentra la dependencia casi total de la importación de insumos. Prácticamente la totalidad de los agroquímicos empleados para el control de plagas insectiles, enfermedades fungosas, control químico de nematodos y la nutrición del cultivo se realiza por materias primas importados. Esto hace que el sector bananero sea dependiente del mercado internacional en cuanto a precio, disponibilidad e inventarios. Los períodos de inestabilidad

económica mundial como la crisis inmobiliaria del año 2009, la pandemia de COVID -19 y recientemente la guerra de Ucrania-Rusia del año 2022, impactaron al sector con mayores costos de transporte, la escasez de materias primas, siendo los fertilizantes uno de los insumos con mayor aumento. Esto significó el crecimiento inmediato de los costos productivos y causó la afectación y deterioro en la calidad y atención de las fincas (Voegelé, 2022, Banco Mundial 2023).

La producción mundial de alimentos presenta varias limitaciones para poder lograr el aumento de los rendimientos y así satisfacer la demanda de alimentos ante el aumento de la población. De igual forma, los cultivos en general y el caso de la producción de bananos de consumo fresco se encuentran amenazados por los métodos actuales de producción los cuales en el largo plazo afectan la capacidad de los suelos para brindar los servicios ecosistémicos.

A nivel internacional existe un mayor compromiso para la producción de alimentos utilizando tecnologías más amigables con el ambiente. La legislación actual se moviliza hacia la compensación de la huella de carbono, los abonos verdes y las alternativas a los insumos sintéticos utilizados en la producción de alimentos.

En el caso del cultivo comercial de bananos las acciones futuras deben permitir la disminución en la utilización de fertilizantes convencionales tomando en cuenta los retos del cultivo para la disminución de la afectación sobre el suelo, la inocuidad de los procesos, la salud de los consumidores, la protección de los aplicadores de insumos, la sostenibilidad de la actividad, adaptación a la variación climática y el acceso a mercados.

#### **1.4 Bacterias promotoras de crecimiento (BPCV)**

La rizosfera está definida como una delgada porción de suelo que rodea a las raíces de la planta. Esta zona es rica en nutrientes gracias a la exudación radical, siendo una zona de intensa actividad microbiana. Esta microbiota, muestra un vínculo cercano entre sí y con la raíz, mediante la emisión de metabolitos, la biodisponibilidad de nutrientes o mediante la fijación biológica de nitrógeno (Chauhan et al., 2015).

Algunas de estas bacterias han demostrado su capacidad para promover el crecimiento vegetal en diferentes cultivos gracias a la síntesis de pequeñas cantidades de fitohormonas las cuales les concede resiliencia a condiciones de estrés por temperatura extrema, déficit hídrico y cambio climático (Kanwal et al., 2017; Wang & Li, 2019).

Las BPCV están presentes en una gran cantidad en los suelos, ambientes y por ende en las rizosferas de muchos cultivos. Algunas de las sustancias que sintetizan son metabolitos como: antibióticos, sideróforos, fitohormonas, lipopolisacáridos y otras sustancias relacionadas con el aumento de la productividad. Algunos de los géneros son: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Serratia* y *Rhizobium* (Méndez et al., 2018; Wang & Li, 2019).

La capacidad de fijación de nitrógeno por parte de las bacterias de vida libre ha sido comprobada en múltiples estudios en diversos cultivos como soja, trigo, caña de azúcar y una variedad de hortalizas (Ateş & Kivanç, 2020; Bakhshandeh et al., 2020; Basu et al., 2017). Algunos géneros de estas BPCV pueden solubilizar macronutrientes del suelo tales como potasio, fósforo, azufre y zinc a través de la emisión de ácidos orgánicos como citrato, oxalato, acetato los cuales degradan la estructura cristalina de las arcillas volviendo disponible los elementos (Khatoon et al., 2020).

La incorporación de BPCV en la producción de banano se considera una opción para disminuir parcialmente la utilización de fertilizantes nitrogenados de origen sintético. Esto volvería al cultivo más resiliente desde el punto de vista de adaptación a los cambios ocasionados en el ambiente, disminuyendo su dependencia de insumos importados. Al utilizar insumos sostenibles y mejorar la inocuidad la aceptación de la fruta en el mercado internacional aumentaría (Mekonnen & Kibret, 2021).

## **1.5 Antecedentes**

La Corporación Bananera Nacional (CORBANA) realizó una prospección en la cual estableció una colección de 323 aislamientos (Rodríguez, 2014). Para su estudio se utilizaron 19 características morfológicas, lo que permitió reunir en 20 grupos estos candidatos con 89,2% de similitud. El objetivo de este estudio fue obtener candidatos (aislamientos) con efecto antagónico / supresivo, sobre el nematodo *Radopholus similis* en condiciones de invernadero. Entre los resultados se obtuvo un grupo de aislamientos que mejoró el crecimiento de las plantas ( $P < 0,05$ ) y el peso fresco de la raíz. Este trabajo pionero sirve de base para seleccionar candidatos con mayores probabilidades de tener las características deseables para ser utilizados como bacterias promotoras de crecimiento, de este proyecto se obtuvieron los aislamientos a utilizar.

## 1.6 Marco Metodológico

Existe escasa información sobre la utilización de *B. cereus* en el cultivo de banano. Las investigaciones relacionadas con el uso de BPCV son desarrolladas principalmente en cultivos anuales (hortalizas) provenientes de países del subtrópico. Según Singh et al., (2020) las especies de *Bacillus* fijadoras de nitrógeno tienen el potencial de usarse como biofertilizante microbiano y biocontroladores en la agricultura.

Para el diseño de los experimentos se utilizó parte de la metodología utilizada por Baset Mia, Shamsuddin, Wahab, et al. (2010). Se modificó el sustrato estéril por suelo representativo de las zonas de producción (este y oeste) así como las dosis de elementos aplicadas ya que se empleó un cultivar diferente. Las variables descriptoras para evaluar el crecimiento fueron similares a las utilizadas en dicho estudio.

El trabajo utilizado para esta investigación es de tipo cuantitativo, esto debido a que los objetivos planteados tuvieron como fin determinar el efecto sobre una población de individuos y para esto se utilizaron un grupo de variables descriptoras del crecimiento de estos individuos. El ambiente se mantuvo controlado para permitir aislar el efecto de causado por los objetos de estudio.

Debido a que se planteó un experimento para estudiar el efecto de aislamientos de *B. cereus* se debió realizar un diseño experimental que permitiera dar respuesta a la hipótesis y a las preguntas de la investigación formuladas. El diseño significó la realización de dos experimentos independientes en los cuales se midieron las variables de interés. El diseño que permitía evaluar los objetivos propuestos fue el de parcela dividida para esto se introdujo una parcela grande en la cual se evaluó el efecto de la variable independiente y en la parcela pequeña a la variable dependiente.

El objetivo general del trabajo de graduación fue estudiar los efectos causados a la plántula de banano (*Musa AAA*) luego de la aplicación de diferentes aislamientos de *B. cereus*. Con este marco de referencia se define como unidad de análisis o estudio a la planta de banano y la población que ella conforma dentro del cada uno de los tratamientos evaluados. La toma de los datos se realizó según la variable a evaluar y un calendario de actividades predefinidas. El experimento tiene por objetivo, la evaluación del efecto de una serie de variables independientes sobre la variable dependiente o aislamiento.

La recolección de datos consistió es un muestreo de la totalidad de la población a la que fue aplicado los efectos de las variables tanto independientes como las dependientes. Durante la evaluación las variables o condiciones atmosféricas se mantuvieron homogéneas para asegurar que la variación en el crecimiento alcanzada al final del período de evaluación fuera una consecuencia de los efectos inducidos en cada tratamiento evaluado.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

El objetivo general comprende el anuncio de lo que se va a investigar, lo que se procura realizar durante el proceso de investigación. El anunciado debe ser claro y debe indicar parte de las acciones o variables a que se van a estudiar durante el proceso de investigación. El objetivo general del presente proyecto fue “Evaluar la capacidad de aislamientos de *Bacillus cereus*: SER-217, SER-23, B71, BF-98 para disminuir el aporte de fertilizante nitrogenado y mejorar el crecimiento de plantas de banano (*Musa AAA*) bajo condiciones de ambiente protegido”.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Establecer la capacidad de los aislamientos SER-217, SER-23, B71-A, BF-98 para promover la producción de biomasa de plantas de banano (*Musa AAA*), en dos suelos de diferente fertilidad, bajo condiciones de ambiente protegido.
2. Evaluar si la disponibilidad de nitrógeno en el suelo afecta la facultad de los aislamientos SER-217, SER-23, B71, BF-98 de mejorar el crecimiento de plantas de banano.
3. Analizar los cambios en el contenido de elementos en el tejido foliar de plantas de banano como una consecuencia de aplicación de los aislamientos SER-217, SER-23, B-71A, BF-98.

## **3. Síntesis**

### **Artículo 1**

Esta sección permite dar respuesta al primer y segundo objetivos propuestos. El primer objetivo es quizás el más importante de cumplir ya que permite responder la interrogante sobre la capacidad de los aislamientos para mejorar el crecimiento de las plantas de banano.



Durante esta etapa se determinó el efecto de la inoculación de cuatro aislamientos de *B. cereus*, sobre cinco variables de vigor: altura de planta, área foliar, contenido de clorofila, peso húmedo y seco de las plantas. Esta evaluación permitió encontrar diferencias en el peso seco total de las plantas.

Este capítulo permitió completar también el segundo objetivo específico. Esto se logró al determinar que una mayor disponibilidad de nitrógeno en el medio de crecimiento afectó la capacidad de los aislamientos estudiados para mejorar el crecimiento. Este elemento demostró ser determinante para inhibir las propiedades de las bacterias.

Por último, se comprueba que dos cepas tienen la capacidad de aumentar la concentración de nitrógeno en los diferentes órganos de la planta. De esta manera se confirman dos efectos ocasionados por estos aislamientos bacterianos a saber, estimulación de crecimiento y una mayor absorción de nitrógeno.

Este primer artículo fue publicado en la revista *Agronomía Mesoamericana* volumen 33(3): Artículo 49614, 2022, la cual pertenece a la Universidad de Costa Rica. Se cuenta con la aprobación por parte de la revista para incluir este artículo en el documento de tesis.

## **Artículo 2**

En esta sección se da seguimiento a los aislamientos que mostraron la capacidad de promover el crecimiento y el contenido de nitrógeno en las plantas de banano. Se evaluó el efecto de estos aislamientos sobre el contenido de los nutrientes potasio (K), fósforo (P), azufre (S) y zinc (Zn) en los pseudotallos y hojas de las plantas. Estos elementos han sido reportados en diferentes investigaciones como nutrientes que son solubilizados a partir del suelo y puestos a disposición de las raíces por acción de las BPCV mejorando su absorción y aumentando el contenido en las plantas.

Los aislamientos BF-98 y SER-23 aumentaron el contenido de zinc en hojas y pseudotallos y el contenido de azufre en los pseudotallos en las plantas sembradas en el suelo proveniente de la zona este. Este resultado no se observó en las plantas que crecieron en el suelo del oeste. El aumento gradual en el aporte de nitrógeno causó la inhibición de los aislamientos.

Este segundo artículo no ha sido sometido a un comité editorial de revista, esta gestión se encuentra en proceso.

## Conclusión

Dos aislamientos demostraron capacidades de promover el crecimiento. Paralelamente se logró comprobar el aumento en el contenido de nitrógeno, azufre, zinc y potasio en diferentes órganos de las plantas de banano producto de la inoculación de estas cepas. La ejecución de las actividades y los resultados alcanzados permitieron responder tanto los objetivos específicos, como el objetivo general. Los aislamientos necesitaron un ambiente en condiciones de déficit de nitrógeno para lograr estos efectos.

## 4. Artículo 1

### Aislamientos de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento y el contenido de nitrógeno en banano (*Musa AAA*)<sup>1</sup>

*Bacillus cereus* isolates on the growth and nitrogen content of banana (*Musa AAA*)

Rodya M. Ortega Bonilla<sup>2</sup>, Pedro Torres Asuaje<sup>2</sup>, Rafael Segura Mena<sup>2</sup>, Fabián Echeverría Beirute<sup>3</sup>, Lidieth Uribe Lorío<sup>4</sup>

#### Resumen

**Introducción.** Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) podrían ser utilizadas como una fuente alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados convencionales en el cultivo de banano (*Musa AAA*). Es necesario la búsqueda de bacterias adaptadas a las condiciones de los suelos de Costa Rica y del cultivo del banano. **Objetivo.** Evaluar el efecto de la inoculación de cuatro aislamientos de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento y el contenido de nitrógeno (N) de plántulas de banano en condiciones de invernadero. **Materiales y métodos.** Se realizaron dos experimentos de forma simultánea en el período

---

<sup>1</sup>Este trabajo formó parte de la Tesis del primer autor, Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, San Carlos, Costa Rica y financiado por la Corporación Bananera Nacional (CORBANA).

<sup>2</sup> CORBANA S.A., Dirección de investigaciones, Apdo. 390-7210, Guápiles, Costa Rica. [rortega@corbana.co.cr](mailto:rortega@corbana.co.cr) (autor para correspondencia; <https://orcid.org/0000-0002-4704-4831>), [ptorres@corbana.co.cr](mailto:ptorres@corbana.co.cr) (<https://orcid.org/0000-0002-2378-1749>), [rsegura@corbana.co.cr](mailto:rsegura@corbana.co.cr), (<https://orcid.org/0000-0003-1372-9928>).

<sup>3</sup> Instituto Tecnológico Costa Rica, Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE). Alajuela, Costa Rica [fecheverria@itcr.ac.cr](mailto:fecheverria@itcr.ac.cr) (<https://orcid.org/0000-0002-7238-220X>).

<sup>4</sup> Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas, Laboratorio de Microbiología Agrícola, San José, Costa Rica [lidieth.uribe@ucr.ac.cr](mailto:lidieth.uribe@ucr.ac.cr). (<https://orcid.org/0000-0002-8276-7824>).

de abril – septiembre 2020 en el Centro de Investigaciones de CORBANA, La Rita, Limón, Costa Rica. Cuatro aislamientos de *B. cereus* inoculados en plantas de banano (*Musa* AAA) a las cuales se les fertilizó con cuatro dosis de nitrógeno de forma semanal. El diseño consistió en parcelas divididas, donde la parcela principal estuvo conformada por cuatro niveles de N: 0, 33, 66, 100 % de la dosis; y la parcela pequeña por los aislamientos bacterianos y el testigo. Se midieron las variables altura de planta, contenido de clorofila, el área foliar de la tercera hoja, peso fresco y seco de raíces, cormo, pseudotallo y hojas, así como el contenido de nitrógeno en cada órgano. **Resultados.** El Experimento N° 1: Las plantas inoculadas con el aislamiento SER-23 presentaron el mayor peso seco total. Experimento N° 2: El mayor peso seco total se observó en las plántulas inoculadas con el aislamiento BF-98. La aplicación de las bacterias SER-23 y BF-98 aumentó significativamente el contenido de nitrógeno en todos los órganos evaluados. **Conclusiones.** La inoculación de los aislamientos SER-23 y BF-98 estimuló el aumento de la biomasa y contenido de nitrógeno en las plantas de banano, este incremento dependió de la disponibilidad de nitrógeno y el tipo de suelo.

**Palabras clave:** bacterias promotoras de crecimiento, fijación biológica de nitrógeno, aumento de crecimiento, nutrición alternativa.

### Abstract

**Introduction.** The use of growth-promoting rhizobacteria (RPC) in banana cultivation (*Musa* AAA) has become increasingly necessary in the face of the challenges posed by climate change and the search for sustainability. The application of isolates adapted to the soil conditions of Costa Rica in the banana crop (*Musa* AAA) could improve yields and reduce the use of synthetic agricultural inputs. **Objective.** To evaluate the effect of the inoculation of four *Bacillus cereus* isolates on the growth and nitrogen content of banana seedlings under greenhouse conditions. **Materials and methods.** Two experiments were carried out simultaneously in the period April - September 2020 at the CORBANA Research Center, La Rita, Limón, Costa Rica. Four isolates of *B. cereus* were inoculated in banana plants (*Musa* AAA). Four doses of nitrogen were applied to the plants weekly. The design consisted of divided plots, where the main plot consisted of four levels of N: 0, 33, 66, 100% of the dose; and the small plot for the bacterial isolates and the control. The variables plant height, chlorophyll content, leaf area of the third leaf, fresh and dry weight of roots, corm, pseudostem and leaves, as well as nitrogen content in each organ were measured. **Results.** Experiment No. 1: Isolation SER-23 obtained the highest total dry weight. Experiment No.

2: The highest total dry weight was for the BF-98 isolate. The application of the bacteria SER-23 and BF-98 significantly increased the nitrogen content in all the organs evaluated.

**Conclusions.** The inoculation of isolates SER-23 and BF-98 caused an increase in biomass and nitrogen content in banana plants, this increase depended on the availability of nitrogen and the type of soil.

**Keywords:** plant growth promoting bacteria, biological nitrogen fixation, growth enhancement, alternative nutrition.

## Introducción

Se estima que para el año 2050 la población mundial llegará a 9 700 millones de personas (Naciones Unidas, 2020). Debido a lo anterior, habrá una mayor demanda de materias primas y alimento que requerirá un manejo más eficiente de los recursos utilizados en la agricultura además de técnicas de producción más sostenibles.

Durante décadas, la Revolución Verde promovió un modelo de agricultura dependiente de insumos (fertilizantes, insecticidas, herbicidas, plaguicidas). Dicho modelo se estableció bajo un esquema de manejo intensivo para lograr altas producciones (monocultivo, mejoramiento genético, regadío, altas densidades, entre otros). Este modelo ocasionó el deterioro del agroecosistema, lo cual se reflejó en el incremento de plagas y enfermedades más resistentes a plaguicidas, convirtiéndose en un modelo de producción no sostenible (Altieri et al., 2015; Khatoon et al., 2020; Nicholls et al., 2017).

El uso prolongado de altas cantidades de fertilizantes nitrogenados amoniacales provoca en el suelo el aumento de la acidez, pérdida y desbalance de bases y afecta su calidad y salud, e impacta en la productividad del cultivo (Segura et al., 2015; Singh et al., 2011). El uso intensivo de insumos ha provocado que los agroecosistemas bananeros sean más susceptibles a las condiciones ambientales adversas, aumenta la fluctuación de los costos productivos y hace el cultivo de esta fruta menos rentable (Gamez et al., 2019; Baset Mia, Shamsuddin, Wahab, et al., 2010).

En la actualidad se estudia la capacidad de ciertas bacterias de la rizosfera (rizobacterias) para suplir las necesidades nutricionales del cultivo de forma biológica, estimular el sistema defensivo y promover crecimiento vegetal (Chauhan et al., 2015). Algunos de los mecanismos implicados en la acción de estos agentes biológicos incluyen: a- fijación biológica de nitrógeno, b-producción de sideróforos y antibióticos, c-

solubilización de fósforo, zinc y azufre, d- aumento de la eficiencia de la absorción de agua, e- inducción de la resistencia sistémica ante fitopatógenos y f- producción de fitohormonas que inducen tolerancia al frío, sequía, salinidad y contaminación (Khatoon et al., 2020; Meena et al., 2017; Ruzzi & Aroca, 2015; Shameer & Prasad, 2018).

El género *Bacillus* es uno de los grupos más estudiados por su gran abundancia en una diversidad agrosistemas. Dichas bacterias son gram positivas, en forma de bastón, pueden ser aerobios obligados o facultativos y dan positivo a la prueba de catalasa. La especie *B. thuringiensis* puede vivir en condiciones extremas y ser utilizada como insecticida natural. Otras especies como *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. genus* producen sideróforos, auxinas y amonio (Ferreira et al., 2019). Las especies *B. megaterium* y *B. mycoides* han sido relacionados con la fijación biológica de nitrógeno en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Singh et al., 2020).

La aplicación de *B. cereus* en frijol mungo (*Vigna mungo*) en condiciones de invernadero incrementó entre 47 y 85% el peso seco del tallo (Azeem et al., 2021) . La utilización de un consorcio de *B. cereus* y *P. moraviensis* ocasionó entre un 18 y 30% de aumento del peso fresco y una mayor altura de la planta trigo (Hassan & Bano, 2015). Un consorcio formado por *Mesorhizobium* + *B. cereus* en garbanzo (*Cicer arietinum*) aplicado en condiciones de campo incrementó un 5% la altura de planta y un 6% el peso de 100 granos (Kaur et al., 2020). La aplicación de una cepa de *B. cereus* en fresa (*Fragaria vesca*) en condiciones de invernadero sin la aplicación de fertilizantes duplicó los rendimientos del primer racimo de fruta cosechada (Kurokura et al., 2017) .

En el cultivo de banano (*Musa AAA*), se han identificado más de 20 aislamientos pertenecientes a 20 diferentes géneros, con propiedades como: fijación biológica de N, producción de ácido indol acético (AIA) y solubilización de fósforo (Marcano et al., 2016). La aplicación de un aislamiento de *B. subtilis* se ha relacionado con el incremento en el peso seco de plantas de banano (Posada et al., 2016).

El uso de rizobacterias se considera una opción viable para: a- sustituir de forma parcial el requerimiento de nitrógeno del cultivo que es aportado por el fertilizante de origen sintético (Mekonnen & Kibret, 2021), b- promover la demanda del mercado por fruta certificada como ecológica y sostenible (Côté et al., 2010; FAO, 2021; U.S. International Trade Commission, 2020) y c- ayudar a la adaptación de condiciones extremas como: déficit hídrico e inviernos más lluviosos, ocasionado por el cambio climático.

Las RPCV tienen una limitada capacidad de adaptación en ambientes diferentes al de su origen y una baja tasa de sobrevivencia durante su proceso de preservación. La

selección de organismos con mayor capacidad de sobrevivencia es un factor determinante para el éxito de cualquier programa de RPCV. La capacidad para incrementar materia seca y contenido nutricional deben ser cualidades intrínsecas de las RPCV. El Laboratorio de Control Biológico de CORBANA evalúa microorganismos con dichas cualidades. Estas bacterias se aislaron de la rizosfera de raíces de bananos cultivados en suelos de alta producción.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación de cuatro aislamientos de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento y el contenido de nitrógeno (N) de plántulas de banano en condiciones de invernadero.

## **Materiales y métodos**

### **Ubicación sitio de evaluación**

Se llevaron a cabo dos experimentos en forma simultánea en un invernadero perteneciente a la Corporación Bananera Nacional localizado en el cantón de Pococí, Provincia de Limón, Costa Rica. Las coordenadas de ubicación son 10,268246 latitud N, 83,775061 longitud O, y una elevación de 115 msnm. Los experimentos se desarrollaron entre los meses de abril a septiembre de 2020. La humedad relativa fue del 90,1 %, la temperatura promedio del aire 27,15 °C y la radiación solar de 325,1  $\text{wm}^2$  durante el período experimental.

### **Selección del suelo utilizado en ambos experimentos**

Se seleccionaron dos suelos representativos de las zonas de producción ubicadas al este y al oeste del río Reventazón en la zona Caribe de Costa Rica (López & Espinosa, 1995). El suelo proveniente de la zona este (Experimento 1) posee una suma de bases mayor a 30  $\text{cmol (+) L}^{-1}$  mientras que el suelo de la zona oeste (Experimento 2), tenía 15  $\text{cmol (+) L}^{-1}$ , además, de presentar variaciones en el contenido de calcio, magnesio, potasio, fósforo y materia orgánica (Cuadro 1). Los suelos se extrajeron hasta una profundidad de 10 cm de la superficie en áreas de la entrecalle, cultivadas con banano. Cada muestra de suelo se homogenizó por separado y luego se esterilizaron en un horno a 70 °C por un período de 2 horas.

En ambos suelos se determinó: el pH, la acidez extractable, Al, P, K, Ca, Mg, S, elementos menores y porcentaje de materia orgánica. La extracción se realizó mediante la solución Mehlich 3, desarrollada por Mehlich (1984). El pH del suelo se extrajo en KCl según

metodología de Díaz-Romeu & Hunter (1978). Asimismo, la acidez extraíble y  $Al^{+3}$  se determinaron con el método de Thomas (1983). El porcentaje de materia orgánica se realizó de acuerdo con la metodología de Walkley & Black (1934).

**Cuadro 1.** Propiedades químicas y físicas de los suelos utilizados en dos experimentos provenientes de las zonas este y oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

**Table 1.** Chemical and physical characteristics of the soils used in two experiments from the East and West production zones of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

Parámetros	Este	Oeste
Mat. Org. (%)	3,7	5,9
pH	6,5	5,9
$Al^{+3}$ (cmol(+))l <sup>-1</sup>	0	0
Acidez (cmol(+))l <sup>-1</sup>	0,06	0,08
Nitrógeno (%)	0,21	0,34
Ca (cmol(+))l <sup>-1</sup>	22	10
Mg (cmol(+))l <sup>-1</sup>	7,0	3,8
K (cmol(+))l <sup>-1</sup>	2,5	2,0
P (mg L <sup>-1</sup> )	105	27
Fe (mg L <sup>-1</sup> )	268	152
Cu (mg L <sup>-1</sup> )	6,3	5,2
Zn (mg L <sup>-1</sup> )	17,5	6,7
Mn (mg L <sup>-1</sup> )	79	18
B (mg L <sup>-1</sup> )	0,48	0,32
$\Sigma'$ bases (cmol(+))l <sup>-1</sup>	32	16
Arcilla (%)	33	8
Limo (%)	40	28
Arena (%)	27	63
Textura suelo	Franco arcilloso	Franco arenoso

## **Preparación de los aislamientos bacterianos y estandarización del inóculo utilizado**

Las cepas utilizadas en los experimentos fueron B-71, BF-98, SER-217 y SER-23 de *B. cereus*, facilitadas por el Laboratorio de Control Biológico (LCB) de CORBANA. Los aislamientos se extrajeron de suelo rizosférico de plantaciones comerciales de banano *Musa* (AAA) sub. Cavendish. El criterio de selección de estos suelos se basó en su mayor peso radical y una menor población del nematodo barrenador *Radophulus similis* en la plantación (Rodríguez, 2014).

Para la reactivación de los aislamientos, se utilizó el procedimiento empleado por el LCB y descrito por Rodríguez (2014). Las rizobacterias se conservaron en placas con agar nutritivo (AN) a -30 °C, mediante el sistema CRIOBANK. Con ayuda de un asa bacteriológica, se tomó un abalorio y se trasvasó y distribuyó de forma homogénea a una nueva placa con AN. Las placas fueron selladas e incubadas por 48 h a 30 °C. Una vez reactivado cada aislamiento se colocó en una matriz líquida compuesta por 5 gl<sup>-1</sup> de peptona proteasa y 3 gl<sup>-1</sup> de extracto de carne a pH = 7. La suspensión bacteriana se mantuvo en agitación por cuatro días a 150 rpm y 30 °C. Al finalizar el período de incubación, se realizó un control de calidad de la suspensión para lo cual se inoculó 25 µl del fermento en placas de Petri con AN y se distribuyó de forma homogénea sobre su superficie con un Drigalsky estéril, luego, las placas se incubaron a 30 °C en oscuridad por 48 h. Después de este lapso se comprobó que no ocurriera el crecimiento de bacterias u hongos diferentes a la rizobacteria de interés.

## **Etapas de enraizamiento, aclimatación y primera inoculación**

Como unidad experimental se utilizaron plántulas de banano (*Musa* AAA) subgrupo Cavendish cv. Grande Naine proporcionadas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos (LCT) de CORBANA. Las plantas permanecieron en un medio de crecimiento estéril en ausencia de suelo hasta alcanzar la fase III (plántulas con cuatro o cinco hojas abiertas y 50 mm altura, con desarrollo radical que permite la etapa de aclimatación). Al culminar esta fase, se realizó una primera inoculación con las bacterias previo a su trasplante a bandejas. Para la inoculación, las raíces descubiertas se sumergieron en una solución compuesta por una parte de la suspensión bacteriana concentrada y cuatro partes de agua destilada estéril. La suspensión contenía 1x10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. El período de exposición de las raíces en el inóculo microbiano fue de 30 min. Luego, las plantas se sembraron en bandejas de 96 celdas con "peat moss" (sustrato). El período de aclimatación de las plantas en el invernadero fue de ocho semanas. Durante este lapso todas las plantas recibieron una aplicación semanal de



fertilizantes foliares con potasio, calcio, magnesio, boro y zinc según el procedimiento normal utilizado en CORBANA. En las plantas testigo se incluyó el nitrógeno dentro del programa de fertilización foliar, mientras que las plantas tratadas con las bacterias se omitió este elemento. Las plantas se regaron dos veces al día durante esta etapa.

### **Fase de crecimiento y reinoculación**

Al finalizar la etapa de enraizamiento y aclimatación, las plántulas se trasladaron a un invernadero de crecimiento donde se sembraron en potes de 1,8 L de capacidad con los suelos provenientes de las dos zonas mencionadas. El primer experimento se sembró con el suelo de la zona este, mientras que el segundo experimento con el suelo de la zona oeste. Luego de sembrado, las plantas se inocularon con 100 mL de la solución diluida compuesta por una parte de la suspensión bacteriana concentrada y cuatro partes de agua destilada estéril de cada una de las bacterias, a las tres, seis y nueve semanas posteriores al trasplante.

### **Diseño de tratamientos**

Los tratamientos consistieron en dos factores. El factor uno comprendió un testigo sin aplicación de N y tres dosis de nitrógeno semanales: 1 - 0 %, 2 - 33 %, 3 - 66 % y 4 - 100 %. El factor dos consistió en los cuatro aislamientos bacterianos ya descritos y un testigo sin bacteria. La interacción de las cuatro dosis de nitrógeno y las cuatro bacterias más el testigo formaron 20 tratamientos los cuales se presentan en el Cuadro 2.

### **Mantenimiento de experimentos**

El programa de fertilización semanal consistió en 100 mL de una solución nutritiva enriquecida con macro y micronutrientes más la dosis de nitrógeno correspondiente al tratamiento. El contenido mineral de dicha solución consistió en 7,0; 28,3; 29,6; 16,4; 21,3; 0,01; 0,05; 0,02; 0,006; 0,001; 1,1 mg de  $P_2O_5$ ,  $K_2O$ ,  $CaO$ ,  $MgO$ , S, B, Mn, Zn, I<sup>-</sup>, Mo y Fe, respectivamente. Para Cu y Co, se aplicaron 0,06 y 0,06  $\mu g$ . La dosis de nitrógeno se especificó en el diseño de tratamientos. Además, se aplicaron 100 ml de agua por pote dos veces por semana. Para el combate de la sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*), se aplicó mancozeb al 1 % del producto comercial (Vondoceb®) una vez por semana. Se eliminaron las hojas bajas senescentes, brotes secundarios y tejido con síntomas de sigatoka negra.

**Cuadro 2.** Descripción de los tratamientos utilizados en la evaluación de cuatro aislamientos de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento y el contenido de nitrógeno de plántulas de banano (*Musa AAA*) en condiciones de invernadero. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

**Table 2.** Description of the treatments used in the evaluation of four *Bacillus cereus* isolates on the growth and nitrogen content of banana (*Musa AAA*) seedlings under greenhouse conditions. National Banana Corporation (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

<b>Tratamiento</b>	<b>Nitrógeno aplicado (%)</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Descripción</b>
1	0	Testigo	Soln. Nutritiva + 0 mg N
2	33	Testigo	Soln. Nutritiva + 8,48 mg N
3	66	Testigo	Soln. Nutritiva + 16,96 mg N
4	100	Testigo	Soln. Nutritiva + 25,7 mg N
5	0	SER-217	RPCV + Soln. Nutritiva + 0 mg N
6	33	SER-217	RPCV + Soln. Nutritiva + 8,48 mg N
7	66	SER-217	RPCV + Soln. Nutritiva + 16,96 mg N
8	100	SER-217	RPCV + Soln. Nutritiva + 25,7 mg N
9	0	SER-23	RPCV + Soln. Nutritiva + 0 mg N
10	33	SER-23	RPCV + Soln. Nutritiva + 8,48 mg N
11	66	SER-23	RPCV + Soln. Nutritiva + 16,96 mg N
12	100	SER-23	RPCV + Soln. Nutritiva + 25,7 mg N
13	0	B-71	RPCV + Soln. Nutritiva + 0 mg N
14	33	B-71	RPCV + Soln. Nutritiva + 8,48 mg N
15	66	B-71	RPCV + Soln. Nutritiva + 16,96 mg N
16	100	B-71	RPCV + Soln. Nutritiva + 25,7 mg N
17	0	BF-98	RPCV + Soln. Nutritiva + 0 mg N
18	33	BF-98	RPCV + Soln. Nutritiva + 8,48 mg N
19	66	BF-98	RPCV + Soln. Nutritiva + 16,96 mg N
20	100	BF-98	RPCV + Soln. Nutritiva + 25,7 mg N

## **Diseño Experimental**

El diseño utilizado fue el de parcela dividida en ambos experimentos. La parcela grande consistió en las cuatro dosis de nitrógeno ya mencionados (nivel 1). La parcela pequeña se conformó por los cuatro aislamientos bacterianos y un testigo sin bacteria (nivel 2). Cada interacción entre estos dos factores se repitió en diez oportunidades (una planta por repetición, diez plantas por tratamiento). La distribución tanto de las parcelas grandes como de las pequeñas se realizó completamente al azar.

## **Medición de variables experimentales**

Las variables que a continuación se describen fueron evaluadas durante el crecimiento de las plantas como al momento de la cosecha de los dos experimentos realizados.

### **Clorofila y área foliar**

Para la medición de la clorofila, se utilizó un medidor marca Apogee® modelo CGM-200. Así mismo, se realizó la medición del índice de área foliar según la fórmula  $IAF = \text{Largo} \times \text{Ancho} \times 0,08 \times N^{\circ} \text{ hojas} \times 0,0662$  ( $N^{\circ}=1$ ) (Murray, 1960). Tanto la medición de la clorofila como el área foliar se realizaron en la hoja número tres (hoja expandida, y se utilizó la hoja recién emitida como referencia). Ambas variables se evaluaron cada tres semanas.

### **Determinación del peso seco**

El primer experimento se cosechó a las 16 semanas de trasplante y el segundo a las 17 semanas. La diferencia en el período de cosecha en ambos experimentos se debió a la falta de disponibilidad de espacio en los hornos de secado. Las variables medidas fueron: a- la altura (cm) medida desde la base de la planta hasta el vértice formado por las dos últimas hojas emitidas, b- el peso seco de la raíz, cormo, pseudotallo y hojas (g). Tres días antes de la cosecha se suspendió el riego para facilitar la separación de las raíces y el suelo. Para obtener el peso seco se procedió a separar las diferentes estructuras de la planta en bolsas rotuladas de papel para su pesaje. El peso seco total se obtuvo al secar las muestras en un horno a 75 °C hasta peso constante.

### **Determinación del contenido de nitrógeno en los órganos de la planta**

Para determinar el contenido de nitrógeno, se procedió a la molienda de las muestras secadas al horno. Luego, cada muestra se homogenizó para extraer tres

submuestras, las cuales se analizaron por separado. El contenido de nitrógeno total se determinó por el método de combustión seca (Elementar Analysensysteme, 2011). Para minimizar los costos del análisis de los diferentes órganos, se seleccionaron los aislamientos BF-98 y SER-23, los cuales mostraron un mayor peso seco y diferencias en crecimiento con respecto al testigo.

### **Análisis estadístico**

A las variables de crecimiento se les aplicó un análisis de varianza según el diseño de parcelas divididas, en el cual cada parcela grande recibió aleatoriamente un mismo nivel de nitrógeno, mientras que la parcela pequeña recibió un aislamiento bacteriano diferente. Se comprobó que los datos satisfacían los supuestos del análisis de varianza. El análisis se realizó mediante la aplicación de la función *lme* (linear mixed effect) del paquete *nlme* del programa estadístico R (Pinheiro et al., 2020; R Core Team, 2020). Para la estimación de las medias globales de los niveles de N en las plantas tratadas con los aislamientos y sus combinaciones (NxA), se utilizó la función *emmeans* (Lenth et al., 2021). Para probar la tendencia lineal de las dosis crecientes de N, así como el efecto conjunto del testigo de N con respecto a las dosis mayores que cero, se utilizó la función *contrast* del mismo paquete *nlme* (Pinheiro et al., 2020). Las medias de los aislamientos se compararon entre sí mediante una prueba de Tukey al 5 % de significancia, con la función *cld* del paquete *multcomp* (Hothorn et al., 2008).

## **Resultados**

### **Determinación de la altura de planta, índice de área foliar (IAF) y clorofila**

Al agrupar los promedios de cada tratamiento por dosis de nitrógeno, se observa que el promedio de la altura de las plántulas sembradas en el suelo proveniente de la zona este (Experimento N° 1) presentó un efecto lineal positivo ( $P=0,0358$ ) (Cuadro 3) por la aplicación de nitrógeno. La aplicación de nitrógeno promovió una mayor altura de las plantas con respecto a los tratamientos sin nitrógeno ( $P\leq 0,0291$ ).

En los dos experimentos (Cuadro 3 y Cuadro 4), no se logró determinar cambios para la altura de la planta como consecuencia de la aplicación de los aislamientos o de la dosis de nitrógeno, ni entre tratamientos ( $P>0,05$ ).

**Cuadro 3.** Medias, análisis de contrastes y estudio de tendencia lineal para la altura de planta, índice de área foliar (IAF) y contenido de clorofila, de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculadas con aislamientos de *Bacillus cereus* en combinación con cuatro dosis de nitrógeno semanal, y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

**Table 3.** Analysis and linear trend study for plant height, leaf area index (IAF) and chlorophyll content, of banana seedlings (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup), inoculated with isolates of *Bacillus cereus* in combination with four weekly doses of nitrogen using as substrate a soil from the eastern production zone of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

Variable	% Nitrógeno	Aislamientos					± EE
		B-71	BF-98	SER-217	SER-23	Testigo	
Altura (cm)	0	26,4	27,4	27,9	28,3	26,4	1,25
	33	28,4	29,3	28,1	29,2	27,7	1,26
	66	30,1	27,7	28,8	28,5	28,6	1,26
	100	29,1	28,9	29,9	28,6	29,1	1,25
	Efecto N	Pr>F					
	N=0 vs N>0	0,0632	0,4152	0,4572	0,7566	0,1344	
	Efecto lineal	0,0910	0,6220	0,2423	0,9937	0,1008	
IAF	0	1,67	1,84	1,70	1,77	1,57	0,12
	33	1,92	2,08	1,97	2,02	1,81	0,12
	66	2,09	2,10	2,11	2,10	1,90	0,12
	100	2,01	2,04	2,02	2,10	1,91	0,12
	Efecto N	Pr>F					
	N=0 vs N>0	0,0164	0,0974	0,0199	0,0287	0,0329	
	Efecto lineal	0,0267	0,2488	0,0440	0,0477	0,0442	
Clorofila (µmol m <sup>2</sup> )	0	54,5	46,4	48,2	50,0	45,0	2,85
	33	46,8 AB	49,8 AB	56,5 A	45,0 B	44,8 B	2,85
	66	45,3	54,3	44,0	45,5	43,5	2,85
	100	49,0	46,9	45,6	46,6	51,8	2,85
	Efecto N	Pr>F					
	N=0 vs N>0	0,0302	0,2344	0,8806	0,1993	0,5948	
	Efecto lineal	0,1650	0,6318	0,1190	0,4495	0,1379	

N: 10; EE: error estándar promedio. / N: 10; EE: average standard error.

**Cuadro 4.** Medias, análisis de contrastes y estudio de la tendencia lineal para la altura de planta, índice de área foliar (IAF) y contenido de clorofila, de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculadas con aislamientos de *Bacillus cereus* en combinación con cuatro dosis de nitrógeno semanal, y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

**Table 4.** Means, contrast analysis and linear trend study for plant height, leaf area index (IAF) and chlorophyll content, of banana seedlings (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup), inoculated with isolates of *Bacillus cereus* in combination with four weekly doses of nitrogen using as substrate a soil from the western production zone of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

Variable	%	Aislamientos					± EE
		Nitrógeno	B-71	BF-98	SER-217	SER-23	
Altura (cm)	0	23,8	22,6	23,2	23,4	21,6	0,9
	33	23,2	23,5	22,4	23,3	21,6	0,9
	66	24,7	23,3	23,0	23,9	23,6	1,0
	100	22,9	23,1	23,7	23,4	21,3	0,9
	Efecto N	Pr>F					
	N=0 vs N>0	0,8891	0,4968	0,8762	0,8917	0,5597	
	Efecto lineal	0,7840	0,7339	0,6192	0,8749	0,7410	
IAF	0	1,58	1,42	1,43	1,41	1,27	0,09
	33	1,43	1,49	1,33	1,43	1,32	0,09
	66	1,53	1,59	1,38	1,47	1,52	0,10
	100	1,47	1,44	1,57	1,60	1,47	0,09
	Efecto N	Pr>F					
	N=0 vs N>0	0,3811	0,4207	0,9806	0,3861	0,1270	
	Efecto lineal	0,5983	0,7052	0,2627	0,1427	0,0662	
Clorofila (µmol m <sup>2</sup> )	0	45,9	48,6	52,6	52,9	46,6	3,3
	33	52,5	49,8	51,8	48,8	49,6	3,4
	66	47,7	48,0	53,5	53,5	45,2	3,4
	100	47,3	48,1	49,8	57,4	45,5	3,3
	Efecto N	Pr>F					
	N=0 vs N>0	0,3999	0,9879	0,8216	0,9424	0,9805	
	Efecto lineal	0,9724	0,8318	0,6571	0,2271	0,5920	

N: 10; EE: error estándar promedio. / N: 10; EE: average standard error

Para el experimento sembrado con suelo de la zona este, e independientemente del tratamiento, la suma de todas las aplicaciones de N promovió un mayor IAF de la hoja número tres con respecto al tratamiento sin nitrógeno ( $P \leq 0,0001$ ) (Cuadro 3). Sin embargo, este efecto alcanzado por el nitrógeno no fue observado cuando se aplicó la bacteria BF-98 ( $P=0,0974$ ), pero si ocurrió en los demás tratamientos ( $P \leq 0,0329$ ). Se presentó una tendencia lineal creciente en esta variable con respecto al IAF, para cada tratamiento

( $P \leq 0,0477$ ) y de forma general ( $P = 0,0002$ ), al agrupar los promedios de cada tratamiento por dosis de nitrógeno. Esta tendencia tampoco se observó en las plantas inoculadas con la bacteria BF-98 ( $P = 0,2488$ ).

En el experimento sembrado con suelo de la zona oeste (Experimento N°2) la aplicación o no de nitrógeno o por la acción de los aislamientos, no logró causar cambios sobre IAF (Cuadro 4). En ambos experimentos no se presentaron diferencias entre los tratamientos evaluados.

La determinación de clorofila total no fue influenciada por la acción de las bacterias ni por acción de la dosis de nitrógeno.

### **Peso seco (PS) total de plantas**

Los pesos secos totales se presentan según la ubicación de donde se extrajo el suelo utilizado como sustrato y en el cual se desarrollaron las plantas.

#### **Suelo zona este**

En promedio, las aplicaciones de nitrógeno incrementaron el PS en las plantas testigo y en los aislamientos bacterianos ( $P = 0,0175$ ) y de manera individual para la bacteria SER-23 y el testigo ( $P \leq 0,0222$ ) (Cuadro 5). El aislamiento SER-23 estimuló el crecimiento de la planta en ausencia de fertilizante nitrogenado (Figura 1), al observar un incremento del 25,3 % del PS cuando se aplicó esta bacteria a 0 % N semanal, respecto al Testigo (Prueba Tukey al 95 % de confianza). Posterior a esto SER-23 se inhibió de forma gradual con el incremento de la fertilización nitrogenada. Así mismo, a 0 % N, las plantas inoculadas con las cepas B-71, BF-98 y SER-217 y el testigo presentaron un PS similar.

Todos los tratamientos inoculados con bacterias y el testigo presentaron una PS similar entre la primera (33 % N) y la tercera dosis de N (100 %). Al incrementar la dosis de N, se redujo el efecto estimulante de los aislamientos bacterianos sobre el PS total ( $P = 0,0012$ ) (Figura1). Se observó una tendencia lineal creciente en las diferentes dosis de nitrógeno con respecto al PS, en las plantas inoculadas con los aislamientos BF-98 y en las plantas testigo ( $P \leq 0,0119$ ). Se observó una tendencia lineal creciente ( $P = 0,0167$ ), al agrupar los promedios de cada tratamiento por dosis de nitrógeno.

#### **Suelo zona oeste**

Todas las dosis de nitrógeno incrementaron el PS en las plantas testigo y en aquellas inoculadas con todos los aislamientos bacterianos ( $P = 0,0139$ ), con respecto a las

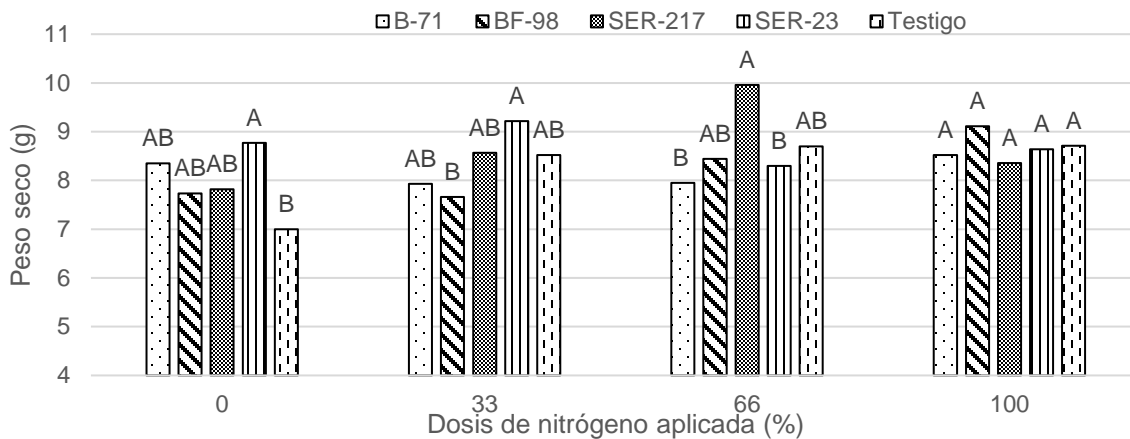
plantas de los tratamientos sin nitrógeno (Cuadro 5). El PS en todos los tratamientos se mantuvo constante e independiente de la dosis de N ( $P=0,0625$ ). La bacteria BF-98 fue el único aislamiento que estimuló el crecimiento de las plántulas (Figura 2). Esto se observó en el aumento de 21,7 y 26,9 % del PS total para las dosis de 33 y 100 %, respectivamente, comparados al Testigo (Prueba Tukey al 95 % de confianza). Las bacterias B-71, SER-23 y SER-217 presentaron un PS similar al testigo. La capacidad de la bacteria BF-98 para promover crecimiento, fue independiente de las dosis de fertilización nitrogenada.

**Cuadro 5.** Análisis de contrastes del efecto de nitrógeno y estudio de tendencia lineal para el peso seco total de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish) inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, utilizando como sustrato suelo proveniente de las zonas este y oeste de producción. Corporación Bananera Nacional (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

**Table 5.** Contrast analysis of the nitrogen effect and linear trend study for the total dry weight of banana seedlings (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) inoculated with *Bacillus cereus* isolates using soil as substrate from the east and west production zone. National Banana Corporation (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

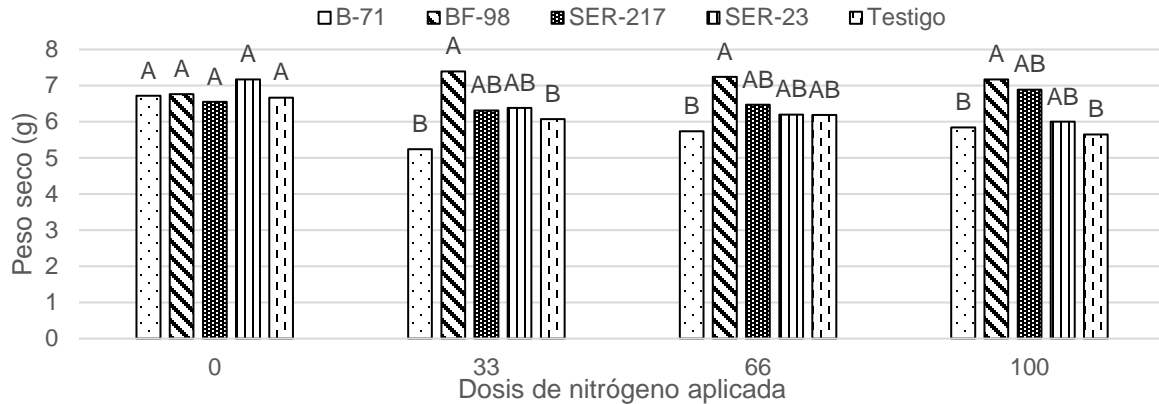
Tratamiento	B-71	BF-98	SER-217	SER-23	Testigo
Este					
P <0,05					
N%=0 vs N%>0	0,6543	0,1668	0,0222	0,9163	0,0017
E linear	0,7695	0,0119	0,1123	0,4808	0,0071
Oeste					
N%=0vs N%>0	0,2419	0,0663	0,9661	0,2657	0,5527
E linear	0,1695	0,4729	0,4324	0,0217	0,0594





**Figura 1.** Peso seco total de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish) inoculadas con aislamientos de *Bacillus cereus* en combinación con cuatro dosis de nitrógeno semanal y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. Barras con una misma letra no son significativamente diferentes (N=10, Tukey,  $p>0,05$ ).

**Figure 1.** Total dry weight of banana seedlings (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) inoculated with isolates of *Bacillus cereus* in combination with four weekly doses of nitrogen using soil from the Eastern Zone of production of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. Bars with the same letter are not significantly different (N=10, Tukey,  $p>0.05$ ).



**Figura 2.** Peso seco de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish) inoculadas con aislamientos de *Bacillus cereus*, en combinación con cuatro dosis de nitrógeno semanal y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. Barras con una misma letra no son significativamente diferentes (N=10; Tukey,  $p>0,05$ ).

**Figure 2.** Dry weight of banana seedlings (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) inoculated with *Bacillus cereus* isolates in combination with four weekly doses of nitrogen using soil as substrate from the western production zone of the Caribbean from Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020. Bars with the same letter are not significantly different (N=0; Tukey,  $p>0.05$ ).

### Contenido de nitrógeno en los diferentes órganos de la planta

Se determinó el contenido de nitrógeno de las plantas tratadas con los aislamientos que presentaron un mayor crecimiento, los resultados se agruparon según la ubicación donde se extrajo el suelo utilizado como sustrato.

#### Suelos zona este

En los suelos de la zona este en las que se realizó el estudio, las bacterias BF-98 y SER-23 ayudaron a la absorción del N dentro del tejido de las plantas incluso en los tratamientos a los que no se aplicó nitrógeno (Cuadros 6 y 7). Este efecto se observó en el incremento de nitrógeno en hojas, pseudotallo y cormo, en comparación con las plantas testigo ( $P\leq 0,0340$ ); además de un efecto sinérgico entre la aplicación de las cepas BF-98 y SER-23 y la fertilización nitrogenada a diferentes dosis. El contenido de nitrógeno en el

pseudotallo, cormo y raíz se incrementó por efecto de estas bacterias ( $P \leq 0,0070$ ) en conjunto con las diferentes dosis de nitrógeno (33 a 100 % N). Por el contrario, en el contenido de nitrógeno de las hojas se observó una relación inversa entre la bacteria BF-98 y la fertilización nitrogenada. El contenido de nitrógeno de las hojas de plantas inoculadas con la bacteria BF-98 fue menor que el testigo entre las dosis 66 % a 100 % de nitrógeno ( $P < 0,0001$ ).

En ausencia de fertilización nitrogenada, la bacteria SER-23 incrementó la absorción del N dentro del tejido del cormo y pseudotallo con respecto a BF-98 ( $P < 0,0001$ ). Por el contrario, el contenido de nitrógeno foliar y radicular fue similar entre las plantas inoculadas con las diferentes cepas bacterianas. La bacteria SER-23 presentó mayor sinergia con la fertilización nitrogenada que la BF-98. A diferentes dosis de nitrógeno, la bacteria SER-23 aumentó la absorción de nitrógeno en hojas, pseudotallo y cormo ( $P \leq 0,0296$ ), con respecto a la bacteria BF-98. Sin embargo, esta diferencia entre bacterias no se encontró en el contenido de nitrógeno de la raíz ( $P \geq 0,3876$ ), entre estas dos bacterias. De manera general, todas las partes de la planta de banano incrementaron el contenido de nitrógeno a medida que se incrementó la dosis de N ( $P \leq 0,0007$ ). Las sumas de los tratamientos con aplicaciones de N presentaron un mayor contenido de N respecto a los tratamientos que no recibieron aporte de este elemento ( $P < 0,0001$ ) con excepción de las raíces del testigo ( $P = 0,6598$ ).

### **Suelos zona oeste**

En los suelos de la zona oeste en las que se realizó el estudio, la inoculación con las bacterias BF-98 y SER-23 promovió una mayor absorción de N en las diferentes partes de las plantas de banano (Cuadros 8 y 9) en ausencia de la aplicación de este nutriente y con la aplicación de 33 % N. Esto fue apreciable en un mayor contenido de nitrógeno en hojas, pseudotallo, cormo y raíces con 0 % N y 33 % N, con respecto al testigo sin bacterias ( $P \leq 0,0161$ ). Además, se observó un efecto antagonista en la acción biofertilizante realizada por las bacterias BF-98 y SER-23 y la fertilización nitrogenada a una dosis mayor de (33 % N). El contenido de nitrógeno de las hojas y cormo de plantas aplicadas con bacterias BF-98 y SER-23 fue menor que el testigo para la dosis de 100 % N ( $P \leq 0,0113$ ).

**Cuadro 6.** Medias del contenido de nitrógeno, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno y estudio de la tendencia lineal para las hojas y el pseudotallo de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish) inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

**Table 6.** Means nitrogen content, orthogonal contrasts, nitrogen effect analysis and linear trend study for leaves and pseudostem of banana seedlings (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) inoculated with *Bacillus cereus* isolates using as substrate a soil from the eastern production zone of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA) Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

Dosis N (%)	Hojas				Pseudotallo			
	0	33	66	100	0	33	66	100
BF-98	3,15	3,40	3,50	3,78	2,71	4,02	4,23	5,01
SER-23	3,20	3,52	3,66	3,88	3,04	4,32	4,67	5,16
Testigo	3,04	3,40	3,58	3,85	2,57	3,74	4,36	4,83
EE	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,04	0,04	0,04
Contrastes	P<0,05							
BF-98 – SER-23	0,1910	0,0003	<0,0001	0,0021	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0296
BF-98 - Testigo	0,0004	1	0,0135	0,0182	0,0340	0,0001	0,0657	0,0070
SER-23 - Testigo	<0,0001	0,0003	0,0100	0,6455	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
N%=0 vs N%>0, Tendencia.								
	N>0 vs N=0		Lineal		N>0 vs N=0		Lineal	
BF-98	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
SER-23	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
Testigo	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	

N: 10; EE: error estándar promedio. / N:10; EE: average standard error.

**Cuadro 7.** Medias del contenido de nitrógeno, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno y estudio de tendencia lineal para la raíces y cormo de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish) inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

**Table 7.** Means nitrogen content, orthogonal contrasts, nitrogen effect analysis and linear trend study for roots and corm of banana seedlings (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) inoculated with *Bacillus cereus* isolates using as substrate a soil from the eastern production zone of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

Dosis N (%)	Raíz				Cormo			
	0	33	66	100	0	33	66	100
BF-98	2,10	2,43	2,62	2,88	2,36	3,23	3,79	4,14
SER-23	2,14	2,68	2,55	2,79	2,60	3,73	3,92	4,17
Testigo	2,12	1,96	2,15	2,33	2,18	2,84	3,52	3,95
EE	0,05	0,05	0,05	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02
Contraste					P<0,05			
BF-98 - SER-23	0,8238	0,0037	0,5282	0,3876	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,3482
BF-98 – Testigo	0,9358	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
SER-23 – Testigo	0,9667	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
N%=0 vs N%>0, Tendencia.								
	N>0 vs N=0		Lineal		N>0 vs N=0		Lineal	
BF-98	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
SER-23	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
Testigo	0,6598		0,0007		<0,0001		<0,0001	

N: 10; EE: error estándar promedio. / N:10; EE: average standard error.

**Cuadro 8.** Medias del contenido de nitrógeno, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el pseudotallo de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

**Table 8.** Means nitrogen content, orthogonal contrasts, nitrogen effect analysis, linear trend study and Analysis of variance for leaves and pseudostem of banana seedlings (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) inoculated with isolates of *Bacillus cereus* using as substrate a soil from the western production zone of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

Dosis (%)	Hojas				Pseudotallo			
	0	33	66	100	0	33	66	100
BF-98	4,07	4,63	4,65	4,39	4,50	5,42	5,37	4,94
SER-23	3,99	4,51	4,60	4,64	4,36	5,06	5,45	5,31
Testigo	3,78	4,50	4,78	4,85	3,83	4,66	5,34	5,51
EE	0,01	0,01	0,01	0,01	0,08	0,08	0,08	0,08
Contraste	P<0,05							
BF-98 - SER-23	0,0017	<0,0001	0,0604	<0,0001	0,4803	0,0143	0,7402	0,0117
BF-98 - Testigo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,9716	0,0002
SER-23 - Testigo	<0,0001	0,7729	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,0059	0,6008	0,2096
N%=0 vs N%>0, Tendencia.								
	N>0 vs N=0		Lineal		N>0 vs N=0		Lineal	
BF-98	<0,0001		<0,0001		<0,0001		0,0018	
SER-23	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
Testigo	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	

N:10; EE: error estándar promedio. / N: 10; EE: average standard error.

En ausencia de fertilización nitrogenada, la bacteria SER-217 incrementó la absorción de nitrógeno en el tejido foliar y las raíces con respecto a BF-98 ( $P \leq 0,0326$ ). Sin embargo, el contenido de nitrógeno alcanzado por el cormo y pseudotallo fue similar entre las bacterias. La bacteria SER-23 presentó mayor sinergia con la fertilización nitrogenada que la BF-98. Para las dosis de 0 % y 33 % N la bacteria BF-98 aumentó la absorción de N en hojas, pseudotallo y raíces ( $P \leq 0,0326$ ). Por el contrario, para las dosis de 66 % N se igualó el comportamiento de ambas bacterias ( $P \geq 0,0604$ ) y para la dosis de 100 % N la bacteria SER-23 incrementó la absorción de nitrógeno en hojas, raíces, pseudotallo y cormo ( $P \leq 0,0117$ ).

De manera general todas las partes de la planta de banano aumentaron el contenido de nitrógeno a medida que se incrementó la dosis de N ( $P \leq 0,0018$ ), con excepción de los cormos inoculados con la cepa BF-98 ( $P = 0,1879$ ). Las sumas de los tratamientos con aplicaciones de N aumentaron el contenido de este elemento respecto a los tratamientos sin nitrógeno ( $P < 0,0006$ ).

**Cuadro 9.** Medias del contenido de nitrógeno, contrastes ortogonales, análisis del efecto del nitrógeno y el estudio de tendencia lineal para las raíces y el cormo de las plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica. Año 2020.

**Table 9.** Means nitrogen content, orthogonal contrasts, nitrogen effect analysis and linear trend study for roots and corm of banana seedlings (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) inoculated with *Bacillus cereus* isolates using as substrate a soil from the western production zone of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

Dosis (%)	Raíz				Cormo			
	0	33	66	100	0	33	66	100
BF-98	2,66	3,20	2,96	2,92	3,42	3,98	4,21	3,57
SER-23	2,53	3,01	3,04	3,16	3,19	4,06	4,32	4,39
Testigo	2,28	2,78	2,72	3,06	2,81	3,52	4,23	4,88
EE	0,03	0,03	0,03	0,03	0,11	0,11	0,11	0,11
Contraste	P<0,05							
BF-98 – SER-23	0,0326	0,0014	0,1917	0,0001	0,3116	0,8831	0,7574	<0,0001
BF-98 - Testigo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0175	0,0016	0,0161	0,9959	<0,0001
SER-23 - Testigo	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,1504	0,0532	0,0052	0,8064	0,0113
N%=0 vs N%>0, Tendencia.								
	N>0 vs N=0		Lineal		N>0 vs N=0		Lineal	
BF-98	<0,0001		0,0018		0,0006		0,1879	
SER-23	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
Testigo	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	

N: 10; EE: error estándar promedio. / EE: average standard error.

## Discusión

En el presente trabajo se buscó evaluar el efecto de la inoculación de los aislamientos de *B. cereus*, B-71, BF-98, SER-217 y SER-23 sobre el crecimiento y el



contenido de nitrógeno (N) en plántulas de banano (*Musa AAA*) en condiciones de invernadero.

El incremento del peso seco que alcanzaron las plantas expuestas a los aislamientos BF-98 y SER-23 demuestra que estas bacterias tuvieron capacidad para promover crecimiento vegetal. Dicho efecto de estimulación del crecimiento puede estar asociado a la síntesis de fitohormonas y a procesos fisiológicos que regulan la absorción, transporte, utilización y protección del agua (Basu et al., 2017; Chauhan et al., 2015; Lobo et al., 2019).

El suelo de la zona este de producción presentó condiciones químicas y físicas entre las cuales se destacan un pH de 6,5 y mayores contenidos de Ca, Mg y P, lo que pudo favorecer el efecto de estimulación de crecimiento y ganancia de peso en el tejido vegetal de las plantas inoculadas con la bacteria SER-23. Los resultados sugieren que bajas concentraciones de nitrógeno parecen haber influido en la obtención de mayor peso seco. Una dosis igual a 8,48 mg de nitrógeno semanal o superior a esta cantidad debilitó el efecto estimulante de esta bacteria. Este comportamiento nos hace prever que un suelo con alta disponibilidad de nitrógeno o con la adición de fertilizantes nitrogenados podrían inhibir los efectos causados por este aislamiento. Esta es una característica que podría limitar la utilización de esta bacteria en cultivos intensivos que reciben el aporte regular de nitrógeno. Conclusiones similares fueron dadas por Baset Mia, Shamsuddin, Wahab, et al. (2010), quienes asociaron una disminución de la actividad de los aislamientos como consecuencia de un mayor aporte de fertilizante nitrogenado.

De acuerdo con lo observado, el aislamiento BF-98 requiere de cierta disponibilidad inicial de nitrógeno para promover la ganancia de peso seco. Pero, una vez que el nivel de este elemento se estabilizó en 33 %, no se logró mayor respuesta aun y cuando se incrementó el nitrógeno a niveles mayores (66 % N y 100 % N). Un mayor contenido de nitrógeno en el suelo zona oeste es probable que causara un efecto negativo de promoción de crecimiento vegetal de la bacteria SER-23.

Resultados similares a los encontrados en este estudio con *B. cereus*, han sido descritos por Araújo et al. (2021), quienes con la aplicación de aislamientos de esta especie lograron promover el tamaño de la planta (5,7 %) y el número de hojas (5,3 %), en plántulas de Gran Enano (*Musa AAA*). La bioprospección realizada por Posada et al. (2016) determinó el aumento de un 16 % en el peso seco de las raíces del cultivar Williams (*Musa AAA*) por efecto de la bacteria *B. cereus*. En ninguno de los dos experimentos se encontró efecto sobre el peso seco del pseudotallo, hojas y cormo. Sin embargo, inoculaciones de

Posada et al. (2016) con *Bacillus subtilis* y Araújo et al. (2021) con *B. thuringiensis* en el cultivar Prata Ana, incrementaron peso seco de tallo (34 a 39 %), raíces (68%) Posada et al. (2016) y hojas (32 %) Araujo et al. (2021).

Plantas del cultivar Prata Catarina (AAB) las cuales recibieron aplicaciones de *B. pumilus*, incrementaron su altura, número de hojas, área foliar y PS radical en un porcentaje superior al 100 % (da Silva et al. 2018). La aplicación de *B. amyloliquefaciens* y *P. fluorescens* en plantas del cultivar Williams (*Musa* AAA) promovió el peso fresco (65 %) y seco total (30 %) (Gamez et al., 2019).

En ambos experimentos, las bacterias BF-98 y SER-23 incrementaron el contenido de N en todas las estructuras de la planta. Esto puede ser un indicador de una potencial actividad de fijación de N por parte de las cepas estudiadas (Singh et al., 2020) , motivo por el cual ocurrió un incremento en el contenido de N en la planta. Otros informes incluyen también aumento en la absorción de otros nutrientes como potasio, fósforo, azufre, hierro y zinc (Singh et al., 2011). En esta investigación fue evidente, que una mayor disponibilidad de nitrógeno en el suelo causó un efecto inhibitor de la actividad de fijación de N de los aislamientos BF-98 y SER-23. La cantidad y forma de suministro de nitrógeno es un factor que puede alterar la microbiota de la rizosfera, e inhibe el número y la proporción de bacterias de vida libre, lo cual es un factor determinante para lograr la fijación biológica (Cooper & Scherer, 2012). Esto sugiere que las condiciones de los suelos de la zona Caribe podrían afectar la capacidad de fijación de nitrógeno de estos aislamientos.

Con respecto a la interacción de RPCV y el nitrógeno presente en el suelo, Baset Mia, Shamsuddin, & Mahmood (2010) estudiaron la tasa de fijación de nitrógeno por rizobacterias en plántulas de banano de 45 días de edad. Según estos autores al reducir el aporte de nitrógeno entre 33 % (50 ppm) y 13 % (20 ppm), la tasa de fijación de nitrógeno se incrementó en 13,8 %. Lo cual confirma que una alta disponibilidad de N en el medio podría disminuir la actividad bacteriana de fijación de N.

Cuando se inocularon plantas de tomate con *B. pumilus*, en combinación con un aporte de 150 ppm de nitrógeno se acumuló un 19 % de nitrógeno en el tallo de las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas (Masood et al., 2020). Cuando se omitió el elemento en el sustrato, la aplicación de bacteria no provocó la acumulación del nitrógeno en el tejido vegetal. Dicho resultado sugiere que las bacterias requieren de cantidades pequeñas de nitrógeno como activador inicial del proceso de fijación biológica y promoción de crecimiento.

En esta investigación se realizó la aplicación de 4,7 hasta 14,3 ppm de nitrógeno cada semana. De acuerdo con lo presentado por Masood et al. (2020) y Baset Mia, Shamsuddin, & Mahmood (2010), el N aplicado en el presente ensayo fue una cantidad baja, pero fue suficiente para mejorar el crecimiento y el contenido de este elemento con respecto al testigo. Sin embargo, la menor dosis (4,7 ppm semanal o 33 % N) afectó negativamente la capacidad de los aislamientos para aumentar el contenido de nitrógeno en las hojas en ambos experimentos. La mayor cantidad de nitrógeno total en el suelo de la zona oeste y un mayor aporte de este elemento (9,4 ppm o 66 % N) provocó la disminución del contenido de nitrógeno en los tallos y cormos. Un mayor aporte (9,4 ppm semanal o 66 % N) produjo el mismo impacto de reducción en tallos y cormos de la zona oeste esto como consecuencia del 60 % de nitrógeno total adicional presente en el suelo respecto al experimento N°1. Un factor que podría haber disminuido el porcentaje de nitrógeno en las hojas, pseudotallo y cormo, es el efecto dilución. Dicho efecto ha sido utilizado para explicar cambios ocurridos en la concentración de un elemento en el tejido vegetal debido a la adición de materiales orgánicos e inorgánicos, organismos vivos o condiciones ambientales (Jarrell & Beverly, 1981). Lo anterior implicaría que el contenido de nitrógeno de estos órganos se distribuyó en una mayor biomasa producida por la promoción de las bacterias, lo que ocasionó un menor porcentaje almacenado de este elemento por unidad de peso.

La presencia de trazas de nitrógeno en la solución nutritiva puede ser suficiente para modificar el comportamiento de los aislamientos, ya sea al inhibir o promover la fijación biológica (Baset Mia, Shamsuddin, & Mahmood, 2010). Las poblaciones de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, son afectadas por las propiedades químicas y físicas de los suelos, el régimen de humedad, la estructura y el manejo nutricional (Marcano et al., 2016). Los resultados de esta investigación sugieren que los contenidos de nitrógeno en los suelos afectan la capacidad estimuladora de las bacterias y la capacidad de fijación biológica de nitrógeno, siendo determinante el efecto causado por el aporte de fuentes nitrogenadas de origen sintético.

## **Conclusiones**

Los aislamientos BF-98 y SER-23 promovieron la ganancia de materia seca en las plantas de banano. Este aumento de biomasa disminuyó en respuesta al incremento en el aporte de nitrógeno inorgánico. Un mayor contenido total de nitrógeno en los suelos afectó de forma negativa la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de las bacterias.

La inoculación con los aislamientos BF-98 y SER-23 incrementó el contenido de N de las raíces (8 a 36 %), cormo (4 a 31 %), pseudotallo (2 a 18 %) y hojas (2 a 7 %), que conforman la planta de banano. El aporte de nitrógeno inorgánico causó la inhibición de la fijación biológica lo que provocó la disminución en el porcentaje de contenido de nitrógeno en las hojas y luego en los pseudotallos. Entre las causas se pueden citar una mayor disponibilidad de nitrógeno en el suelo o un efecto de dilución causado por el incremento de biomasa.

La metodología empleada permite dar un paso inicial para seleccionar candidatos con características adecuadas para las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV), los cuales pueden continuar procesos de selección hacia fases de campo. Las etapas posteriores de evaluación deben considerar el contenido de N tanto en el suelo como los aportes de N inorgánico soluble que se realicen.

## Agradecimientos

Se agradece a la colaboración brindada por la Máster Claudiana Carr y el personal del Centro de Control Biológico de CORBANA para la multiplicación de los aislamientos utilizados. A la Máster Ana M. Conejo y al Laboratorio de Biología Molecular de CORBANA, por la ayuda brindada en la identificación de las bacterias. Al Ingeniero Miguel González en la dirección y consejo en la realización del proyecto, así como el personal del Departamento de Fisiología de CORBANA. A la Ingeniera Silvia Masis, del laboratorio de Cultivo de Tejidos de CORBANA, al señor Cristian Rosales quien participó activamente en las evaluaciones.

## Referencias

- Altieri, M. A., Nicholls, C. I., Henao, A., & Lana, M. A. (2015). Agroecology and the design of climate change-resilient farming systems. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(3), 869–890. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0285-2>
- Azeem, M., Hassan, T. U., Tahir, M. I., Ali, A., Arockiam Jeyasundar, P. G. S., Hussain, Q., Bashir, S., Mehmood, S., & Zhang, Z. (2021). Tea leaves biochar as a carrier of *Bacillus cereus* improves the soil function and crop productivity. *Applied Soil Ecology*, 157, Article 103732. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103732>
- Baset Mia, M. A., Shamsuddin, Z. H., & Mahmood, M. (2010). Use of Plant Growth Promoting Bacteria in Banana: A New Insight for Sustainable Banana Production. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(3), 459–467.

- Baset Mia, M. A., Shamsuddin, Z. H., Wahab, Z., & Marziah, M. (2010). Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured *Musa* plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Australian Journal of Crop Science*, 4(2), 85–90.
- Basu, S., Rabara, R., & Negi, S. (2017). Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. *Plant Gene*, 12, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.004>
- Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Selvakumar, G., & Sundaram, S. P. (2015). Novel plant growth promoting rhizobacteria— Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*, 95, 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.05.011>
- Cooper, J. E., & Scherer, H. W. (2012). Nitrogen fixation. In P. Marschner (Ed.), *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (3rd ed., pp. 389-408). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00016-9>
- Côte, F., Tomekpe, K., Staver, C., Depigny, S., Lescot, T., & Markham, R. (2010). Agro-ecological intensification in banana and plantain (*Musa* spp.): an approach to develop more sustainable cropping systems for both smallholder farmers and large-scale commercial producers. *Acta Horticulturae*, 879, 457–463. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.879.50>
- da Silva, C. F. B., de Brito, T. L., Taniguchi, C. A. K., Lopes, L. A., Pinto, G. A. S., & de Carvalho, A. C. P. P. (2018). Growth-promoting potential of bacterial biomass in the banana micropropagated plants. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 22(11), 782–787. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n11p782-787>
- de Araújo, R. C., Almendagna Rodrigues, F., Nadal, M. C., de Souza Ribeiro, M., Carvalho Antônio, C. A., Rodrigues, V. A., de Souza, A. C., Pasqual, M., & Dória, J. (2021). Acclimatization of *Musa* spp. seedlings using endophytic *Bacillus* spp. and *Buttiauxella agrestis* strains. *Microbiological Research*, 248, Article 126750. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126750>
- Díaz-Romeu, R., & Hunter, A. (1978). *Metodología de muestreo de suelos, análisis químico de suelos y tejido vegetal e investigación en invernadero*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. <https://bit.ly/3B1lxAj>

- Elementar Analysensysteme. (2011). *Vario macro cube Elemental Analyzer condensed manual*. Elementar Analysen systeme GmbH. <https://bit.ly/3v3Tf5G>
- Ferreira, C. M. H., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2019). Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of The Total Environment*, *682*, 779–799. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.225>
- Gamez, R. M., Rodríguez, F., Madeiros Vidal, N., Ramirez, S., Vera Alvarez, R., Landsman, D., & Mariño-Ramírez, L. (2019). Banana (*Musa acuminata*) transcriptome profiling in response to rhizobacteria: *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 and *Pseudomonas fluorescens* Ps006. *BMC Genomics*, *20*, Article 378. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5763-5>
- Hassan, T. U., & Bano, A. (2015). The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on soil health and physiology of wheat. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *15*(1), 190–201. <http://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000016>
- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in General Parametric models. *Biometrical Journal*, *50*(3), 346–363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Jarrell, W. M., & Beverly, R. B. (1981). The dilution effect in plant nutrition studies. *Advances in Agronomy*, *34*, 197–224. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60887-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60887-1)
- Kaur, D., Singh, G., & Sharma, P. (2020). Symbiotic Parameters, Productivity and Profitability in Kabuli Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as Influenced by Application of Phosphorus and Biofertilizers. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *20*, 2267–2282. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00293-z>
- Khatoon, Z., Huang, S., Rafique, M., Fakhar, A., Kamran, M. A., & Santoyo, G. (2020). Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. *Journal of Environmental Management*, *273*, Article 111118. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111118>
- Kurokura, T., Hiraide, S., Shimamura, Y., & Yamane, K. (2017). PGPR improves yield of strawberry species under less-fertilized conditions. *Environmental Control in Biology*, *55*(3), 121–128. <https://doi.org/10.2525/ecb.55.121>

- Lenth, R., Buerkner, P., Herve, M., Love, J., Miguez, F., Riebl, H., & Singmann, H. (2021). *Estimated marginal means, aka least-squares means*. R Foundation for statistical computing. <https://bit.ly/3S02fCO>
- Lobo, C. B., Juárez Tomás, M. S., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2019). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*, 219, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>
- López, A., & Espinosa, J. (1995). *Manual de nutrición y fertilización del banano*. International Plant Nutrition Institute, & Corporación Bananera Nacional. <https://bit.ly/3czt4oY>
- Marcano, I. -E., Díaz-Alcántara, C. -A., Urbano, B., & González-Andrés, F. (2016). Assessment of bacterial populations associated with banana tree roots and development of successful plant probiotics for banana crop. *Soil Biology and Biochemistry*, 99, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.04.013>
- Masood, S., Zhao, X. Q., & Shen, R. F. (2020). *Bacillus pumilus* promotes the growth and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization. *Scientia Horticulturae*, 272, Article 109581. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109581>
- Mehlich, A. (1984). Mehlich 3 Soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. *Communications in Soil Science Plant Analysis*, 15(12), 1409–1416. <https://doi.org/10.1080/00103628409367568>
- Mekonnen, H., & Kibret, M. (2021). The roles of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable vegetable production in Ethiopia. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8, Article 15. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00213-y>
- Murray, D. B. (1960). The effect of deficiencies of the major nutrients on growth and leaf analysis of the banana. *Tropical Agriculture*, 37, 97–106.
- Naciones Unidas. (2020). *Desafíos globales. Población*. <https://www.un.org/es/global-issues/population>
- Nicholls, C. I., Altieri, M. A., & Vázquez, L. A. (2015). Agroecología: Principios para la conversión y el rediseño de sistemas agrícolas. *Agroecología*, 10(1), 61–72. <https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/300741/216161>

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, & Organización Mundial de la Salud. (2021). *Acerca del Codex*. Codex alimentarius. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/>
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Eispack, A., Heisterkamp, S., Van Willigem, B., Ranke, J., & R Core Team. (2020). *nlme: Linear and nonlinear mixed effects models* (R package version 3.1-148). R Foundation for statistical computing.
- Posada, L. F., Ramírez, M., Ochoa-Gómez, N., Cuellar-Gaviria, T. Z., Argel-Roldan, L. E., Ramírez, C. A., & Villegas- Escobar, V. (2016). Bioprospecting of aerobic endospore-forming bacteria with biotechnological potential for growth promotion of banana plants. *Scientia Horticulturae*, 212, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.040>
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing* (R 3.6.3). R Foundation for Statistical Computing. <https://bit.ly/3ojkGEY>
- Rodríguez Morales, A. (2014). *Evaluación del efecto de cepas nativas de bacillus sp., aisladas de un suelo supresivo a nemátodos, sobre el nematodo barrenador banano, Radopholus similis (Thorne), y el crecimiento de plantas de banano (Musa AAA) bajo condiciones de vivero* [Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. Repositorio del Tecnológico de Costa Rica. <https://bit.ly/3zlqOCL>
- Ruzzi, M., & Aroca, R. (2015). Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.042>
- Segura, R. A., Serrano, E., Pocasangre, L., Acuña, O., Bertsch, F., Stoorvogel, J. J., & Sandoval, J. A. (2015). Chemical and microbiological interactions between soils and roots in commercial banana plantations (*Musa AAA*, cv. Cavendish). *Scientia Horticulturae*, 197, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.028>
- Shameer, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84, 603–615. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0365-1>
- Singh, J. S., Pandey, V. C., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140(3–4), 339–353. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017>



- Singh Meena, V., Kumari Meena, S., Prakash Verma, J., Kumar, A., Aeron, A., Kumar Mishra, P., Kumar Bisht, J., Pattanayak, A., Naveed, M., & Dotaniya, M. L. (2017). Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. *Ecological Engineering*, 107, 8–32. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.06.058>
- Singh, R. K., Singh, P., Li, H. B., Song, Q. Q., Guo, D. J., Solanki, M. K., Verma, K. K., Malviya, M. K., Song, X. P., Lakshmanan, P., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2020). Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: A comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp. *BMC Plant Biology*, 20, Article 220. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02400-9>
- Thomas, G. W. (1983). Exchangeable cations. In A. L. Page (Ed.), *Methods of soil analysis: Part 2 chemical and microbiological properties*, 9.2.2. (2nd ed., pp. 159–165). American Society of Agronomy, Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c9>
- United States International Trade Commission. (2020). *Global economic impact of missing and low pesticide maximum residue* (Vol 1). <https://www.usitc.gov/publications/332/pub5071.pdf>
- Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1), 29–38. <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>

## 5. Artículo 2

ARTÍCULO CIENTÍFICO por someterse a la revista *Agronomía Mesoamericana*

***Bacillus cereus* sobre el contenido de potasio, azufre, zinc y fósforo en plántulas de banano (*Musa AAA*) bajo condiciones de invernadero**  
***Bacillus cereus* on potassium, sulfur, zinc and phosphorus content in banana seedlings (*Musa AAA*) under greenhouse conditions**

Rodya M. Ortega Bonilla<sup>2</sup>, Pedro Torres Asuaje<sup>2</sup>, Rafael Segura Mena<sup>2</sup>, Fabián Echeverría<sup>3</sup> Beirute, Lidieth Uribe Lorío<sup>4</sup>

### Resumen

**Introducción.** Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) podrían ser utilizadas como biofertilizantes en el cultivo de banano (*Musa AAA*). Para su incorporación en el agroecosistema bananero, es necesario realizar una búsqueda de candidatos idóneos cuyas propiedades les permitan desarrollarse en las condiciones de los suelos de Costa Rica y del cultivo del banano. **Objetivo.** Evaluar el efecto de la aplicación al suelo de dos aislamientos de *B. cereus* (BF-98 y SER-23) sobre el contenido de fósforo (P), potasio (K), azufre (S) y zinc (Zn) en plántulas de banano bajo condiciones de invernadero. **Materiales y métodos.** Dos experimentos fueron realizados de forma simultánea de abril a septiembre de 2020 en el Centro de Investigaciones de CORBANA, La Rita, Limón, Costa Rica. Los aislamientos SER-23 y BF-98 pertenecientes al grupo de *B. cereus* fueron inoculados en plantas de banano (*Musa AAA*) a las cuales se les fertilizó una vez por semana con cuatro dosis de nitrógeno. El diseño consistió en parcelas divididas, donde la parcela principal estuvo conformada por cuatro niveles de N: 0, 33, 66, 100 % de la dosis utilizada en invernadero y la parcela pequeña por los aislamientos indicados y el testigo. Se determinó el contenido de K, P, Zn y S en los tallos y hojas de las plantas. **Resultados.** Los aislamientos utilizados aumentaron el contenido de Zn en tallo y hojas ( $P \leq 0,0313$ ). Se observó un incremento también en tallos para el K ( $P \leq 0,0126$ ) y el S ( $P \leq 0,0386$ ). El uso de una dosis mayor al 33% de nitrógeno y el tipo de suelo afectaron la capacidad de las bacterias para incrementar la concentración de los nutrientes en los tallos y hojas. **Conclusiones.** La inoculación de los aislamientos SER-23 y BF-98 incrementó el contenido de Zn, K y S en las plantas de banano, y fue relacionado con la disponibilidad de nitrógeno y el tipo de suelo.

**Palabras clave:** bacterias promotoras de crecimiento, fijación biológica de nitrógeno, aumento de crecimiento, solubilización de nutrientes.

### Abstract

**Introduction.** Plant growth promoting rhizobacteria (RPCV) could be used as biofertilizers in banana cultivation (*Musa AAA*). For their incorporation into the banana agroecosystem, it is necessary to search for suitable candidates whose properties allow them to develop in the soil conditions of Costa Rica and banana cultivation. **Objective.** To evaluate the effect of soil application of two isolates of *B. cereus* (BF-98 and SER-23) on the content of phosphorus (P), potassium (K), sulfur (S) and zinc (Zn) in banana seedlings under greenhouse conditions. **Materials and methods.** Two experiments were carried out simultaneously from April to September 2020 at the CORBANA Research Center, La Rita, Limón, Costa Rica. Isolates SER-23 and BF-98 belonging to the group of *B. cereus* were inoculated in banana plants (*Musa AAA*) which were fertilized with four doses of nitrogen weekly. The design consisted of divided plots, where the main plot was made up of four levels of N: 0, 33, 66, 100 % of the dose used in the greenhouse and the small plot by the indicated isolates and the control. The content of K, P, Zn and S in the pseudostems and leaves of the plants was determined. **Results.** The isolates used increased the Zn content in pseudostem and leaves ( $P \leq 0.0313$ ). An increase was also observed in pseudostems for K ( $P \leq 0.0126$ ) and S ( $P \leq 0.0386$ ). The use of a dose higher than 33% and the type of soil affected the ability of the bacteria to increase the concentration of nutrients in the pseudostems and leaves. **Conclusions.** The inoculation of the isolates SER-23 and BF-98 increase in the content of Zn, K and S in the banana plants, and was related to nitrogen availability and soil type.

**Keywords:** growth of promoter bacteria, biological nitrogen fixation, growth enhancement, nutrient solubilization.

## Introducción

El banano es uno de los frutos de mayor consumo internacional (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación, 2020). En Costa Rica es la actividad agrícola que más aporta al producto interno bruto (CORBANA, 2022). No obstante, en la actualidad, la inestabilidad de los precios de los insumos agrícolas por efecto de la pandemia de Covid-19 y el conflicto Rusia-Ucrania incrementó significativamente el costo de los fertilizantes (Gerszon et al., 2022; Voegele, 2022).

Ante esta incertidumbre por la fluctuación de los precios internacionales de los insumos agrícolas, surge la necesidad de desarrollar estrategias sostenibles para proveer nutrientes a los cultivos de manera constante y de bajo costo. Diversos estudios han demostrado el potencial de ciertas bacterias de la rizosfera para incrementar el contenido de nutrientes en la planta, lo que las convierte en una alternativa efectiva al uso de fertilizantes convencionales. Estas rizobacterias pueden suplir parte de las necesidades nutricionales del cultivo de forma biológica y promover crecimiento vegetal (Chauhan et al., 2015).

Algunos de los mecanismos que utilizan las rizobacterias promotoras de crecimiento (RPCV) son: a- fijación biológica de nitrógeno (N), b-producción de sideróforos, c- solubilización de potasio (K), fósforo (P), zinc (Zn) y azufre (S), d- aumento de la eficiencia de la absorción de agua, e- producción de fitohormonas que inducen tolerancia al frío, sequía, salinidad y contaminación entre otras (Khatoon et al., 2020; Meena et al., 2017; Ruzzi & Aroca, 2015; Shameer & Prasad, 2018).

La utilización de RPCV puede volverse una herramienta en la agricultura moderna que permita: a-disminuir la dependencia de insumos sintéticos con efectos residuales no deseables (Mekonnen & Kibret, 2021), b- proveer al mercado con alimentos producidos con procesos más amigables con el ambiente y de manera sostenible (Côté et al., 2010; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación, 2021; United States International Trade Commission, 2020), y c- proveer a los cultivos mayor resiliencia a las condiciones extremas ocasionadas por el cambio climático como, déficit hídrico e inviernos más intensos.

El potasio es uno de los nutrimentos de mayor utilización por los cultivos. Este se encuentra en formas no intercambiables en el suelo. Algunas especies de *Bacillus* spp. pueden disolver minerales que contienen potasio lo que incrementa su solubilidad y disponibilidad en el suelo para las plantas (Ferreira et al., 2019).

El fósforo es otro elemento que, si bien se aplica a partir de fuentes solubles, se fija rápidamente en el suelo. Las bacterias pueden sintetizar compuestos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido glucónico y cítrico que ayudan a la solubilización del fósforo. Algunas bacterias pueden realizar síntesis de fosfatasas estas son enzimas que degradan a formas más solubles el fósforo orgánico (Basu et al., 2017). Otras bacterias son capaces de acidificar el sustrato en el que se encuentran o formar quelatos con los cationes, lo cual disminuye la competencia con los fosfatos por los sitios de adsorción (Basu et al., 2017).

Compuestos inorgánicos como el azufre, generalmente se encuentran en forma reducida y gracias a la acción de las BPCV, son oxidados a formas solubles de sulfato. En este proceso participan bacterias de los géneros *Aquaspirillum* sp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., y *Xanthobacter* sp., lo que promueve la asimilación de este nutriente promoviendo su crecimiento (Ferreira et al., 2019).

Se ha demostrado que la inoculación de rizobacterias solubilizadoras de zinc de los grupos *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Serratia* spp., promueven el crecimiento de las plantas e incrementan el contenido de este elemento en cultivos como soya y trigo (Khatoon et al., 2020).

Algunas especies de *Bacillus* como *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. genus* aumentan la absorción de Fe y están relacionadas con la producción de auxinas y amonio (Ferreira et al., 2019).

El laboratorio de Control Biológico LCB de CORBANA tiene una colección de aislamientos de bacterias con potencial biofertilizante. Previamente Ortega et al., (2022) lograron comprobar la capacidad de algunas de estas bacterias en aumentar el contenido de nitrógeno y promover el crecimiento de plántulas de banano (*Musa* AAA) al usar dos aislamientos (BF-98 y SER-23). El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de los aislamientos de *B. cereus* (BF-98 y SER-23) sobre el contenido de fósforo, potasio, azufre y zinc de plántulas de banano en condiciones de invernadero.

## **Materiales y métodos**

El presente documento forma parte del proyecto de investigación de CORBANA titulado: Fuentes biológicas para la nutrición del cultivo de banano. En una primera etapa se consideró el efecto de los aislamientos bacterianos sobre la estimulación del crecimiento vegetativo y la absorción del elemento nitrógeno (Ortega et al., 2022). En esta evaluación se consideró el efecto de dichos aislamientos sobre la absorción de los elementos K, P, S y Zn.

### **El sitio de evaluación**

Se realizaron dos experimentos en simultáneo en un invernadero perteneciente a la Corporación Bananera Nacional (CORBANA) localizado en el cantón de Pococí, Provincia de Limón, Costa Rica. Las coordenadas de ubicación son 10,268246 latitud N, 83,775061 longitud O, y una elevación de 115 msnm. Los experimentos se desarrollaron entre los meses de abril a septiembre de 2020. La humedad relativa fue del 90,1 %, la temperatura

promedio del aire 27,15 °C y la radiación solar de 325,1  $\text{wm}^2$  durante el desarrollo de la evaluación.

### **Selección del suelo utilizado en ambos experimentos**

Para la realización de ambos ensayos se utilizaron suelos que fueran típicos de las dos zonas de producción ubicadas al este y al oeste del río Reventazón en la zona Caribe de Costa Rica (López & Espinosa, 1995). El suelo utilizado en el experimento 1 (zona este) posee una suma de bases mayor a 30  $\text{cmol (+) L}^{-1}$  mientras que el suelo del experimento 2, (zona oeste) tenía 15  $\text{cmol (+) L}^{-1}$  esto por poseer un mayor contenido de calcio, magnesio, potasio, fósforo y menor materia orgánica con relación al suelo de la zona oeste (Cuadro 1). Los suelos se extrajeron hasta una profundidad de 10 cm de la superficie en áreas de la entrecalle, cultivadas con banano. Cada muestra de suelo se homogenizó por separado y luego se esterilizaron en un horno a 70 °C por un período de 2 horas.

A los suelos se les determinó: el pH, la acidez extractable, Al, P, K, Ca, Mg, S, elementos menores y porcentaje de materia orgánica. La extracción se realizó mediante la solución Mehlich 3, desarrollada por Mehlich (1984). El pH del suelo se extrajo en KCl según metodología de Díaz-Romeu & Hunter (1978). Asimismo, la acidez extraíble y  $\text{Al}^{+3}$  se determinaron con el método de Thomas (1983). El porcentaje de materia orgánica se realizó de acuerdo con la metodología de Walkley & Black (1934).

El resumen de las propiedades químicas y físicas de los suelos utilizados en ambos experimentos se encuentran disponibles en el cuadro 1 ubicado en la página 18, del presente documento.

### **Preparación de los aislamientos bacterianos y estandarización del inóculo utilizado**

Se utilizaron dos cepas de *B. cereus* (BF-98, SER-23) facilitadas por el Laboratorio de Control Biológico (LCB) de CORBANA. Los aislamientos se extrajeron de plantaciones comerciales de banano *Musa* (AAA) sub. Cavendish, de los cuales se tomó suelo rizosférico. Los suelos seleccionados corresponden con plantaciones con bajas poblaciones del nematodo barrenador *Radophulos similis* y mayor peso radical (Rodríguez, 2014).

Las rizobacterias se conservaron en placas con agar nutritivo (AN) a -30 °C en el sistema CRIOBANK. Las cepas se reactivación según el procedimiento empleado por el LCB y descrito por Rodríguez (2014). Se tomó una esfera del aislamiento mediante un asa bacteriológica, se trasladó a una nueva placa con AN y distribuyó de forma homogénea

realizando un rayado con la misma. Las placas fueron selladas e incubadas por 48 h a 30 °C. Una vez reactivado cada aislamiento se colocó en un medio líquido compuesto por 5 gl<sup>-1</sup> de peptona proteasa y 3 gl<sup>-1</sup> de extracto de carne a pH = 7. El cultivo bacteriano se mantuvo en agitación por cuatro días a 150 rpm y 30 °C. Al finalizar el período de incubación, se realizó un control de calidad del cultivo para lo cual se inoculó 25 µl del fermento en placas de Petri con AN y se distribuyó de forma homogénea sobre su superficie con un asa de Drigalsky estéril. Luego, las placas se incubaron a 30 °C en oscuridad por 48 h. Posterior al período indicado se comprobó que no ocurriera el crecimiento de bacterias u hongos diferentes a la rizobacteria de interés.

### **Etapas de enraizamiento, aclimatación y primera inoculación**

Se utilizaron plántulas de banano (*Musa AAA*) subgrupo Cavendish cv. Grande Naine como unidad experimental. Al alcanzar las plántulas la fase III esto es cuando obtuvieron cuatro o cinco hojas abiertas y 50 mm de altura se realizó la primera inoculación con las cepas mencionadas previo a su trasplante a bandejas. Las raíces descubiertas se sumergieron en una solución compuesta por una parte del cultivo bacteriano concentrado y cuatro partes de agua destilada estéril. La suspensión contenía  $1 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. El período de exposición de las raíces en el inóculo microbiano fue de 30 min. Al finalizar este período, las plantas se sembraron en bandejas de 96 celdas con “peat moss” (sustrato). Las plantas permanecieron en el invernadero para aclimatación y desarrollo de raíces por un período de ocho semanas. Durante este intervalo, todas las plantas recibieron una aplicación semanal de fertilizantes foliares con potasio, calcio, magnesio, boro y zinc según el procedimiento normal utilizado en CORBANA. En las plantas testigo se incluyó el nitrógeno dentro del programa de fertilización foliar, mientras que en las plantas tratadas con las bacterias se omitió este elemento, esto con el objetivo de evitar la inhibición de las bacterias. Las plantas se regaron dos veces al día durante esta etapa.

### **Fase de crecimiento y reinoculación**

Luego de la etapa de enraizamiento y aclimatación, las plántulas se trasladaron a un invernadero de crecimiento donde se sembraron en potes de 1,8 L de capacidad con los suelos provenientes de las dos zonas de producción (este y oeste). El experimento N° 1 se sembró con el suelo de la zona este, mientras que el experimento N° 2 con el suelo de la zona oeste. Después de sembrado, las plantas se inocularon con 100 mL de la solución diluida compuesta por una parte del cultivo bacteriano y cuatro partes de agua destilada

estéril de cada una de las bacterias, a las tres, seis y nueve semanas siguientes al trasplante.

### **Diseño de tratamientos**

Los tratamientos constaron de dos factores. El factor uno abarcó un testigo sin aplicación de nitrógeno y tres dosis de nitrógeno semanales: 1 - 0 %, 2 - 33 %, 3 - 66 % y 4 – 100 %. El factor dos consistió en los dos aislamientos bacterianos descritos y un testigo sin bacteria. La interacción de las cuatro dosis de nitrógeno y las dos cepas bacterias más el testigo formaron 12 tratamientos (Cuadro 2). Cuadro 2. Descripción de los tratamientos utilizados en la evaluación de dos aislamientos de *Bacillus cereus* el contenido de potasio, fósforo, azufre y zinc en plántulas de banano (*Musa AAA*) bajo condiciones de invernadero. Los tratamientos se utilizaron en ambos experimentos. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

### **Mantenimiento de los experimentos**

Se aplicó un complemento de fertilización semanal el cual consistió en 100 mL de una solución nutritiva enriquecida con macro y micronutrientes más la dosis de nitrógeno correspondiente al tratamiento. El contenido mineral de dicha solución consistió en 7,0; 28,3; 29,6; 16,4; 21,3; 0,01; 0,05; 0,02; 0,006; 0,001; 1,1 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, CaO, MgO, S, B, Mn, Zn, I, Mo y Fe, respectivamente. Para Cu y Co, se aplicaron 0,06 y 0,06 µg. La dosis de nitrógeno se especificó en el diseño de tratamientos. De forma complementaria, se aplicaron 100 ml de agua por pote dos veces por semana. Para el combate de la Sigatoka Negra (*Pseudocercospora fijiensis*), se aplicó mancozeb al 1 % del producto comercial (Vondoceb®) una vez por semana. Se eliminaron las hojas bajas senescentes, brotes secundarios y tejido con síntomas de sigatoka negra.

### **Diseño Experimental**

Para la distribución de las plantas se utilizó la parcela dividida en ambos experimentos. La parcela grande o principal comprendió las cuatro dosis de nitrógeno indicadas (nivel 1). Una segunda parcela de menor tamaño la constituyó las dos cepas bacterianas y un testigo sin bacteria (nivel 2). Cada interacción entre estos dos factores se repitió en diez oportunidades (una planta por repetición, diez plantas por tratamiento). La



asignación tanto de las parcelas grande como de las pequeñas se realizó completamente al azar.

**Cuadro 2.** Descripción de los tratamientos utilizados en la evaluación de dos aislamientos de *Bacillus cereus* el contenido de potasio, fósforo, azufre y zinc en plántulas de banano (*Musa AAA*) bajo condiciones de invernadero. Los tratamientos se utilizaron en ambos experimentos. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

Tratamiento	Nitrógeno aplicado (%)	Aislamiento	Descripción
1	0	Testigo	Soln. Nutritiva + 0 mg N
2	33	Testigo	Soln. Nutritiva + 8,48 mg N
3	66	Testigo	Soln. Nutritiva + 16,96 mg N
4	100	Testigo	Soln. Nutritiva + 25,7 mg N
5	0	SER-23	RPCV + Soln. Nutritiva + 0 mg N
6	33	SER-23	RPCV + Soln. Nutritiva + 8,48 mg N
7	66	SER-23	RPCV + Soln. Nutritiva + 16,96 mg N
8	100	SER-23	RPCV + Soln. Nutritiva + 25,7 mg N
9	0	BF-98	RPCV + Soln. Nutritiva + 0 mg N
10	33	BF-98	RPCV + Soln. Nutritiva + 8,48 mg N
11	66	BF-98	RPCV + Soln. Nutritiva + 16,96 mg N
12	100	BF-98	RPCV + Soln. Nutritiva + 25,7 mg N

RPCV: rizobacteria promotora de crecimiento vegetal.

### Medición de variables experimentales

Las variables que a continuación se describen fueron evaluadas al momento de la cosecha de los dos experimentos realizados.

### Cosecha de plantas

La cosecha de los experimentos se inició a las 16 semanas de trasplante, se procedió a separar las diferentes estructuras raíz, cormo, tallo y hojas en bolsas rotuladas

de papel para su secado y posterior análisis. Las muestras se colocaron en un horno a 75 °C por un período de tres días.

### **Determinación del contenido de potasio, fósforo, azufre y zinc en los tallos y hojas de la planta**

Para determinar el contenido de potasio, fósforo, azufre y zinc, se procedió a la molienda de las muestras secadas al horno. Luego, cada muestra se homogenizó para extraer tres submuestras, las cuales se analizaron por separado. Una vez las muestras secas y molidas fueron a una digestión húmeda con una mezcla de ácido nítrico al 65% y peróxido de hidrógeno al 30% (Díaz-Romeu & Hunter, 1978). El contenido de nutrimentos se determinó mediante un espectrofotómetro de emisión óptico (ICP-OES, Optima 7300, Perkin Elmer 2011). Para minimizar los costos del análisis de los diferentes órganos, se seleccionaron para análisis las hojas y tallos, los cuales representan un mayor porcentaje del peso total en comparación con las raíces y el cormo.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó el mismo análisis estadístico de Ortega et al., (2022). Para las variables “contenido de elementos” se les aplicó un análisis de varianza según el diseño de parcelas divididas, en el cual cada parcela grande recibió aleatoriamente un mismo nivel de nitrógeno, mientras que la parcela pequeña recibió un aislamiento bacteriano diferente. Se comprobó que los datos satisfacían los supuestos del análisis de varianza. El análisis se realizó mediante la aplicación de la función *lme* (linear mixed effect) del paquete *nlme* del programa estadístico R (Pinheiro et al., 2020; R Core Team, 2020). Para la estimación de las medias globales de los niveles de K, P, S y Zn en las plantas tratadas con los aislamientos y sus combinaciones (aislamiento x nivel de nitrógeno), se utilizó la función *emmeans* (Lenth et al., 2021). Para probar la tendencia lineal de las dosis crecientes de N, así como el efecto conjunto del testigo de N con respecto a las dosis mayores que cero, se utilizó la función *contrast* del mismo paquete *nlme* (Pinheiro et al., 2020). Las medias de los aislamientos se compararon entre sí mediante una prueba de Tukey al 5 % de significancia, con la función *cd* del paquete *multcomp* (Hothorn et al., 2008).

## **Resultados**

### **Concentración foliar de P, K, S y Zn en los tallos de las plantas sembradas en un suelo proveniente de la zona este de producción (Experimento N°1)**

#### **Contenido de fósforo**

Al agrupar los promedios de cada tratamiento por dosis de nitrógeno, se observa que la inoculación de las bacterias BF-98 y SER-23 no promovió una mayor absorción del nutriente P en las hojas o el tallo de las plántulas sembradas en el suelo proveniente de la zona este (Figura 1). En promedio las aplicaciones del aislamiento BF-98 aumentaron de 5 a 10% el contenido de fósforo en el tallo a medida que se incrementó la dosis de N ( $P \leq 0,0004$ ). Todas las aplicaciones de N aumentaron un 5% el contenido de P respecto a los tratamientos sin nitrógeno ( $P \leq 0,0003$ ). Este efecto no se observó para las hojas.

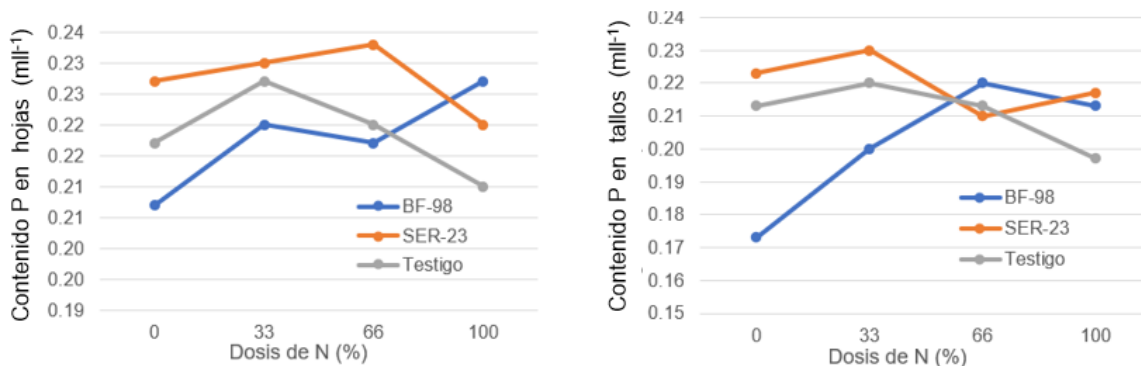
#### **Contenido de potasio**

En los tallos la aplicación del aislamiento SER-23 aumentó el contenido de K cuando se realizó el aporte de N en comparación con el testigo (Figura 2). Al agrupar las aplicaciones de las bacterias BF-98 y SER-23 estas favorecieron un aumento en el contenido del K entre un 6 a 9% al aumentar el aporte de N ( $P < 0,0001$ ). Todas las aplicaciones de N aumentaron el contenido de K en comparación a los tratamientos sin nitrógeno ( $P < 0,0001$ ). Para las hojas de manera general, las aplicaciones de la bacteria BF-98 causaron el incremento del contenido de K un 7%. No se determinó efecto de la aplicación de las bacterias sobre el contenido de K.

#### **Contenido de zinc**

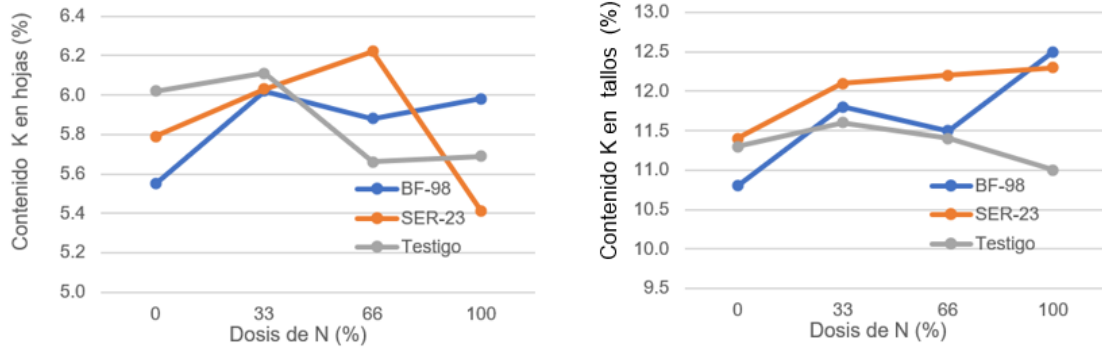
La inoculación de las bacterias BF-98 y SER-23 promovió una mayor absorción de Zn en las diferentes partes de las plantas de banano (Figura 3) en ausencia de la aplicación de N y con el uso de (33 % N). Esto fue apreciable en un aumento del 16 a 18% de zinc en las hojas para los tratamientos inoculados con las bacterias BF-98 y SER-23 y en el tallo un aumento del 15% para las plantas a las que se adicionó la bacteria BF-98 en las dosis 0% N. Por el contrario, se observó una relación inversa entre la acción biofertilizante realizada por las bacterias BF-98 y SER-23 y la fertilización nitrogenada a una dosis mayor de (33 % N). El contenido de Zn de las hojas y tallo de plantas inoculadas con las bacterias BF-98 y SER-23 fue similar al testigo para las dosis de 66 y 100 % N ( $P > 0,05$ ).

En promedio el contenido de zinc aumentó un 17% en el tallo a medida que se incrementó la dosis de N ( $P \leq 0,0303$ ). Este comportamiento se observó también en las hojas únicamente en el testigo ( $P \leq 0,0181$ ). Todas las aplicaciones de N en los tallos aumentaron en 16% el contenido de Zn respecto a los tratamientos sin nitrógeno ( $P \leq 0,0006$ ). Este efecto se observó para las hojas solamente en las plantas testigo ( $P = 0,0046$ ).



% (N)	0				33				66				100											
	P > 0,05				P > 0,05				P > 0,05				P > 0,05											
Contrastes																								
BF-98 - SER-23	0,4457	0,8125	0,5670	0,9114	0,0003	0,0286	0,6341	0,9497	0,0003	0,0286	0,6341	0,9497	0,0003	0,0286	0,6341	0,9497								
BF-98 - Testigo	0,8125	0,9114	0,9770	0,5670	0,0033	0,1792	0,8148	0,2947	0,0033	0,1792	0,8148	0,2947	0,0033	0,1792	0,8148	0,2947								
SER-23 - Testigo	0,8125	0,9770	0,6931	0,8125	0,6341	0,6341	0,9497	0,1792	0,6341	0,6341	0,9497	0,1792	0,6341	0,6341	0,9497	0,1792								
	BF-98				SER-23				Testigo				BF-98				SER-23				Testigo			
linear	0,2801				0,7480				0,6078				0,0004				0,2567				0,1128			
N = 0 vs N > 0	0,2861				0,9338				0,8681				0,0003				0,6216				0,7110			

**Figura 1.** Medias del contenido de fósforo, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.



Contrastes	P>0,05				P>0,05			
	0	33	66	100	0	33	66	100
BF-98 - SER-23	0,4178	0,9973	0,1874	0,0176	0,0010	0,2401	0,0017	0,3301
BF-98 - Testigo	0,0519	0,8838	0,4978	0,3032	0,0126	0,3301	0,8089	<0,0001
SER-23 - Testigo	0,4672	0,9141	0,0183	0,3277	0,5603	0,0126	0,0004	<0,0001

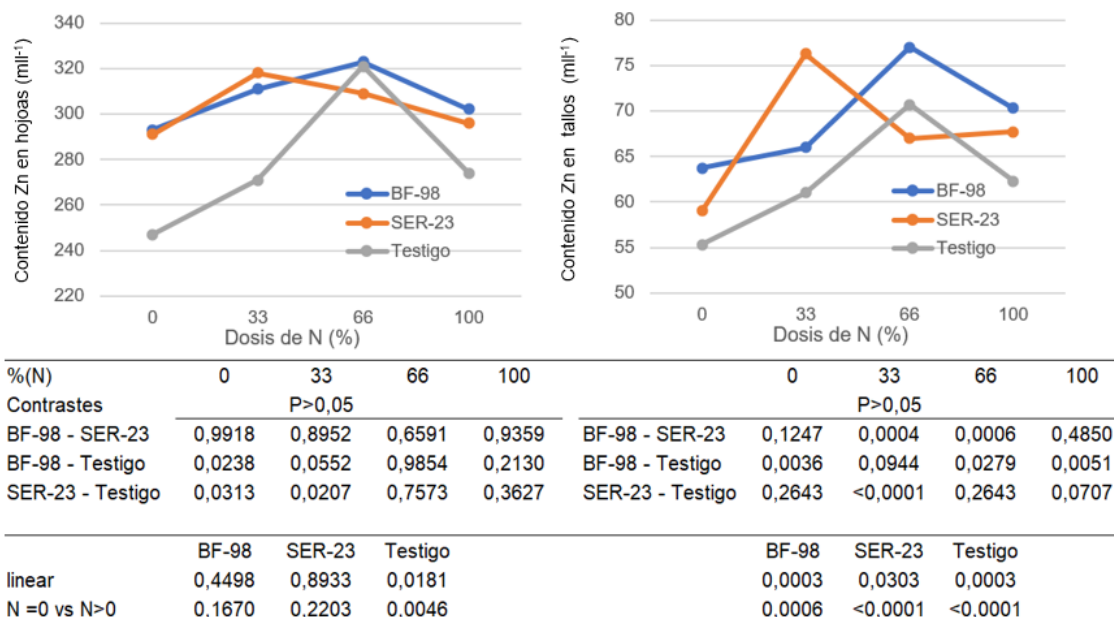
	BF-98	SER-23	Testigo	BF-98	SER-23	Testigo
linear	0,0671	0,1300	0,0256	<0,0001	<0,0001	0,1135
N =0 vs N>0	0,0141	0,5336	0,2136	<0,0001	<0,0001	0,5582

**Figura 2.** Medias del contenido de potasio, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

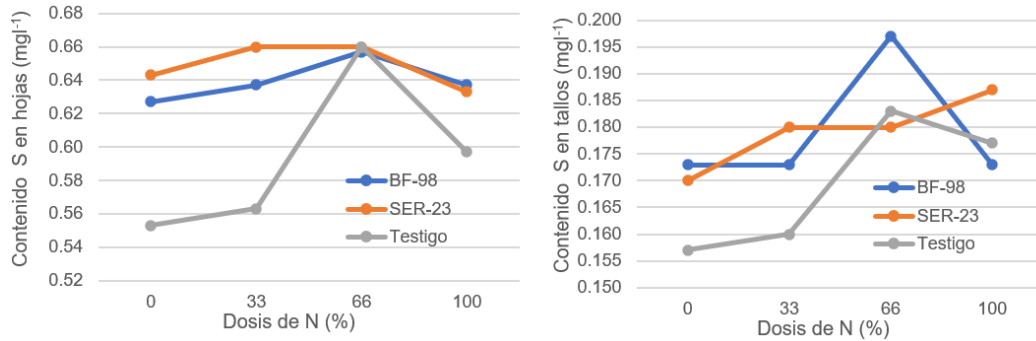
### Contenido de azufre

La inoculación de las bacterias BF-98 y SER-23 promovió una mayor absorción de S en los tallos de las plantas de banano (Figura 4) en ausencia de la aplicación de N y con la aplicación de N (33 %). Esto fue apreciable en un 4 a 10% mayor contenido de azufre en el tallo, con 0 % N y 33 % N, con respecto al testigo ( $P \leq 0,0386$ ). Por el contrario, se observó una relación inversa entre la acción biofertilizante realizada por las bacterias BF-98 y SER-23 y la fertilización nitrogenada a una dosis mayor de (33 % N). El contenido de azufre de los tallos de plantas inoculadas con las bacterias BF-98 y SER-23 fue similar que el testigo para las dosis de 66 % N y 100 % N ( $P > 0,05$ ). Por su parte, la determinación del contenido de S en las hojas mostró una menor influencia por el uso de las bacterias. Esto fue apreciable en el hecho que la bacteria SER-23 promovió la absorción de un 18% mayor contenido de S en este órgano a la dosis de 33% N y para la dosis 0% N mostró igualmente una alta significancia ( $P = 0,0547$ ). Sin embargo, la bacteria BF-98 no mostró esta capacidad.

De manera general, el contenido de azufre aumentó en 3 a 5% en el tallo de las plantas inoculadas con la bacteria SER-23 y el testigo a medida que se incrementó la dosis de N ( $P \leq 0,0048$ ). Este comportamiento no se observó en las hojas. En los tallos todas las aplicaciones de N aumentaron en 8% el contenido de azufre para la bacteria SER-23 y testigo respecto a los tratamientos sin nitrógeno ( $P \leq 0,0072$ ). Este efecto no fue apreciable en las hojas.



**Figura 3.** Medias del contenido de zinc, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.



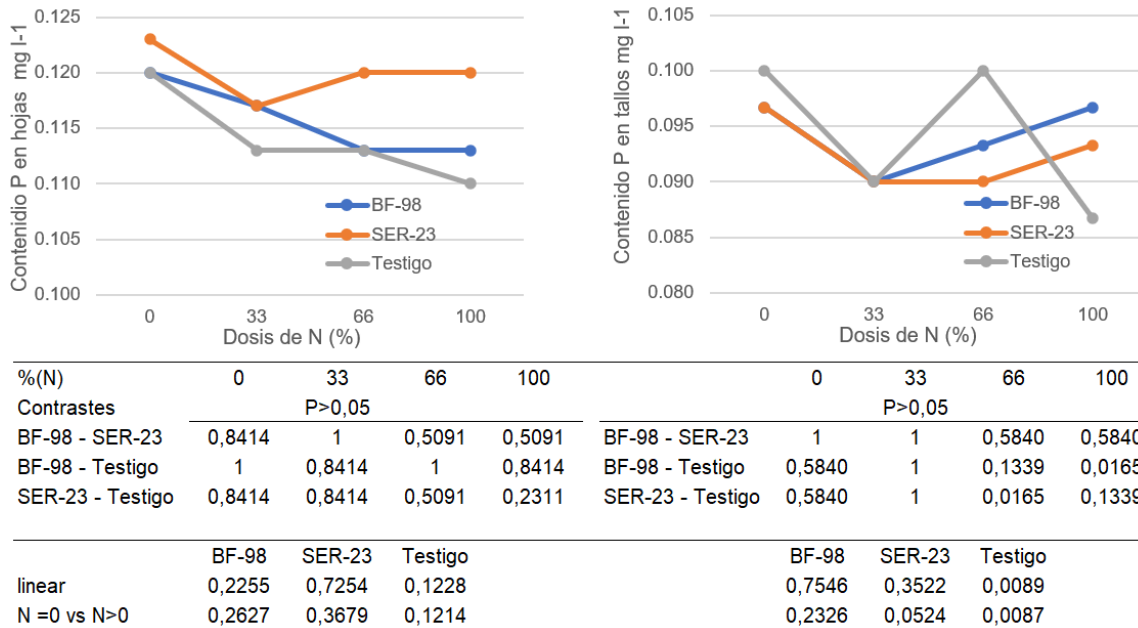
% (N)	P > 0,05				P > 0,05				
	0	33	66	100	0	33	66	100	
Contrastes									
BF-98 - SER-23	0,8929	0,8017	0,9955	0,9955	BF-98 - SER-23	0,7915	0,4039	0,0087	0,0386
BF-98 - Testigo	0,1339	0,1339	0,9955	0,5288	BF-98 - Testigo	0,0087	0,0386	0,0386	0,7915
SER-23 - Testigo	0,0547	0,0371	1	0,5840	SER-23 - Testigo	0,0386	0,0018	0,7915	0,1430
	BF-98	SER-23	Testigo		BF-98	SER-23	Testigo		
linear	0,6702	0,7980	0,0623		0,1602	0,0048	<0,0001		
N =0 vs N>0	0,5829	0,7972	0,0875		0,0736	0,0072	0,0005		

**Figura 4.** Medias del contenido de azufre, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

### Concentración foliar de P, K, S y Zn en los tallos de las plantas sembradas en un suelo proveniente de la zona oeste de producción (Experimento N° 2)

#### Contenido de fósforo

Bajo las condiciones de los suelos de la zona oeste en las que se realizó el estudio, la inoculación de las bacterias BF-98 y SER-23 no promovió una mayor absorción del nutriente P en las hojas o el tallo de las plántulas sembradas en el suelo de la zona oeste (Figura 5). De manera general, en los tallos de los testigos, el contenido de fósforo disminuyó a medida que se incrementó la dosis de N ( $P=0,0089$ ). Este efecto no se observó en los tratamientos inoculados con los aislamientos. En las plantas testigo, todas las aplicaciones de N disminuyeron en 8% el contenido de P respecto a los tratamientos sin nitrógeno ( $P=0,0087$ ).



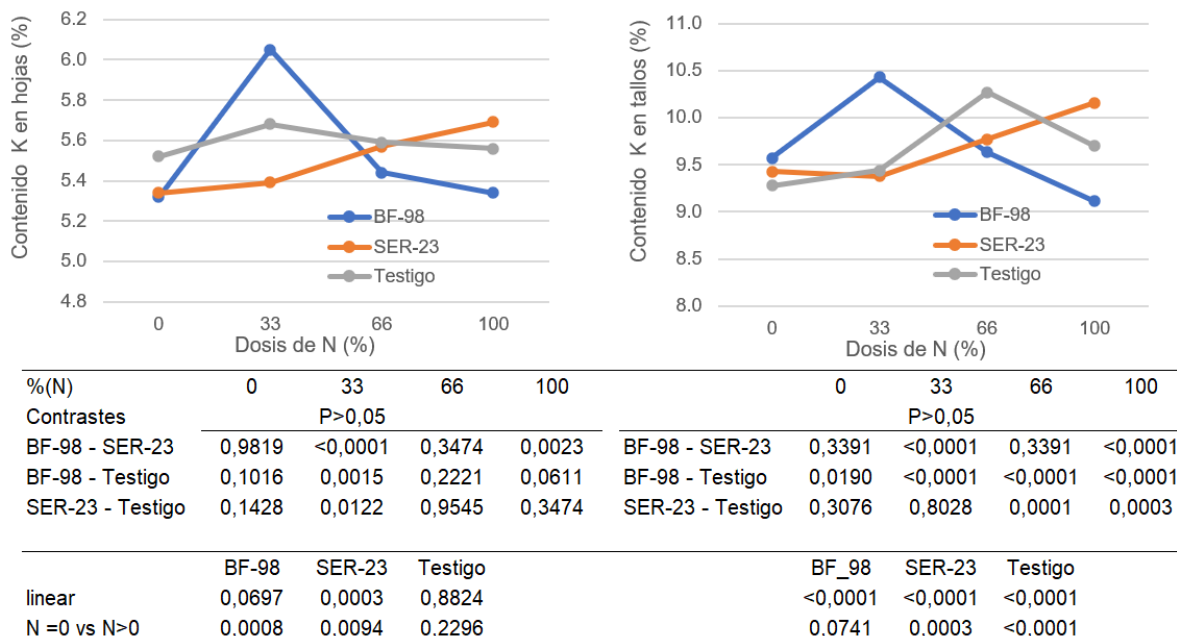
**Figura 5.** Medias del contenido de fósforo, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

### Contenido de potasio

La inoculación de la bacteria BF-98 promovió una mayor absorción de K en los tallos de las plantas de banano (Figura 6) esto en ausencia de la aplicación de N y con la aplicación de una dosis de 33 % de N. Esto fue apreciable al encontrar en 3 y 10% mayor contenido de K en el tallo, para las dosis de 0 % N y 33 % N, con respecto al testigo ( $P \leq 0,019$ ). Por el contrario, se observó un efecto inverso en la acción biofertilizante realizada por la bacteria BF-98 y la fertilización nitrogenada a una dosis mayor de 33 % de N. Esto fue apreciable en un 7% menor contenido de potasio de los tallos de plantas aplicadas con la bacteria BF-98 respecto al testigo para la dosis de 66 y 100 % N ( $P < 0,0001$ ). Este efecto no se logró observar en las hojas. En promedio para el tallo en los tratamientos aplicados con la bacteria BF-98 y los testigos, disminuyó entre un 6 a 8% el contenido de potasio a medida que se incrementó la dosis de N ( $P < 0,0001$ ). El efecto contrario se observó con la aplicación de SER-23 ( $P = 0,0001$ ) en la que las aplicaciones de N aumentaron en 4% el



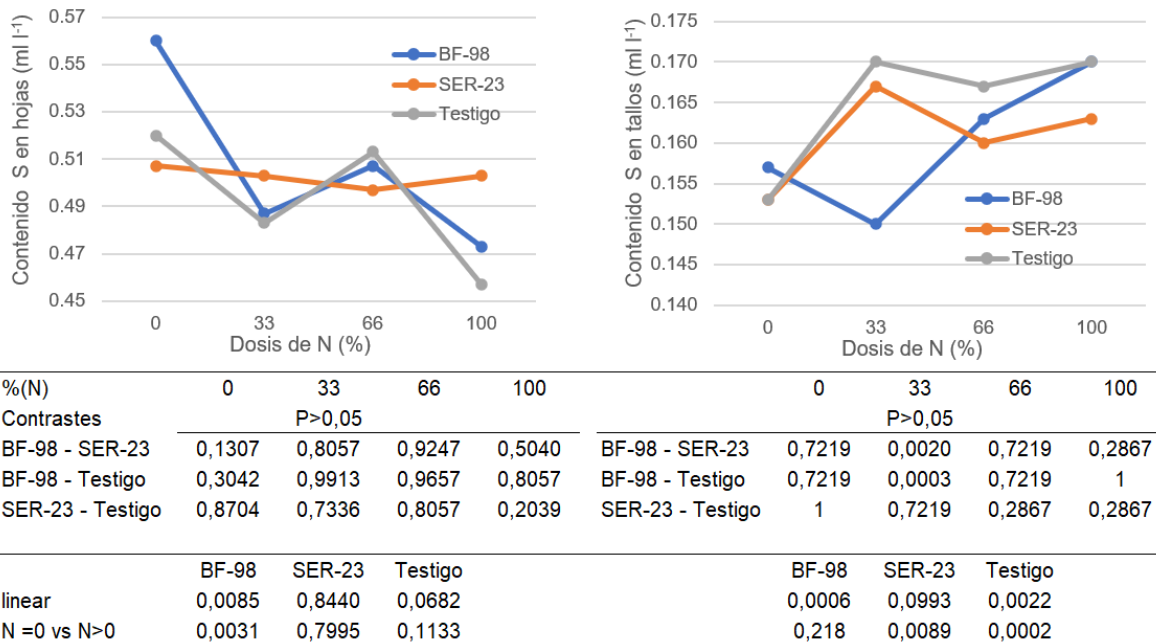
contenido de K con la inoculación de SER-23 ( $P=0,0003$ ) y aumentaron en 6% en el testigo ( $P=0,0001$ ), respecto a los tratamientos sin nitrógeno.



**Figura 6.** Medias del contenido de potasio, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

### Contenido de azufre

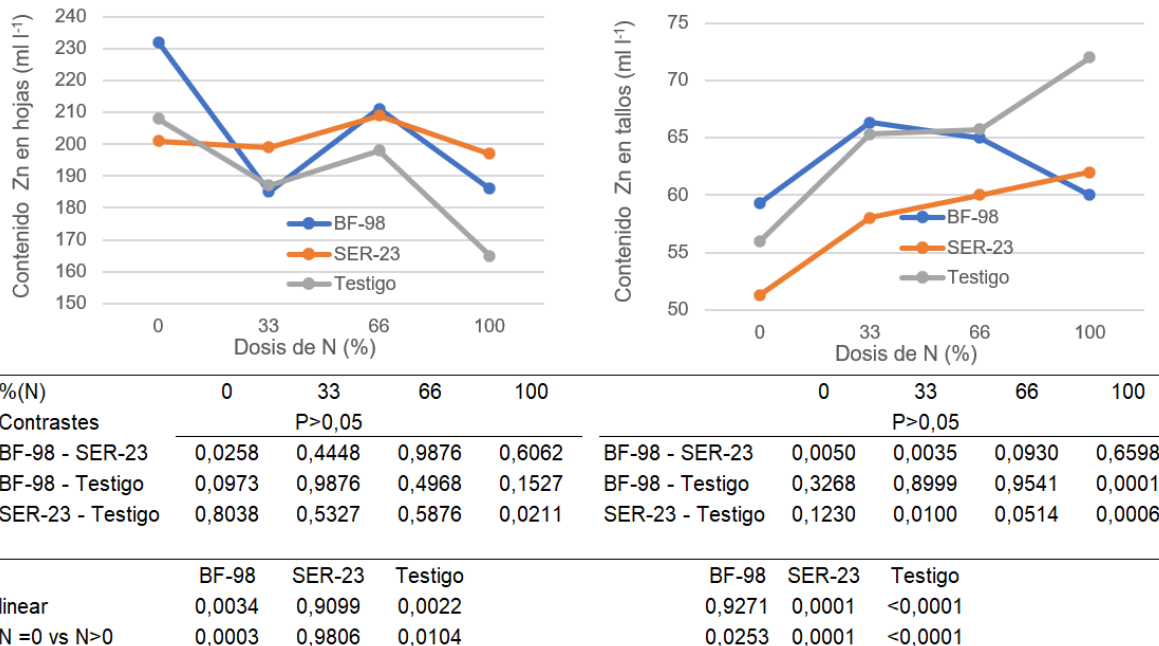
La inoculación de las bacterias BF-98 y SER-23 no promovió una mayor absorción del nutriente S en las hojas o el tallo de las plántulas sembradas en el suelo de la zona oeste de producción (Figura 7). En promedio tanto en hojas como en tallo de las plantas inoculadas con la bacteria BF-98 el contenido de azufre varió a medida que se incrementó la dosis de N ( $P\leq 0,0085$ ) disminuyendo para el primero y aumentando en el segundo caso. Este aumento también se observó en el tallo del testigo. Todas las aplicaciones de N aumentaron el contenido de S para el tallo de las plantas inoculadas con el aislamiento SER-23 y en el testigo y en las hojas únicamente en las plantas tratadas con la bacteria BF-98 respecto a los tratamientos sin nitrógeno ( $P\leq 0,0089$ ).



**Figura 7.** Medias del contenido de azufre, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

### Contenido de zinc

En ausencia de la aplicación de nitrógeno o con la aplicación de este, la inoculación de las bacterias BF-98 y SER-23 no promovió un mayor contenido del nutriente Zn en las hojas o el tallo de las plántulas (Figura 8). En las hojas de las plantas inoculadas con la bacteria BF-98 y el testigo, así como en los tallos tratados con el aislamiento SER-23 y el testigo, el contenido de azufre en promedio varió a medida que se incrementó la dosis de N ( $P \leq 0,0034$ ) disminuyendo en 11 a 20% en las hojas y aumentando entre 3 a 16% en los tallos. Las aplicaciones de N modificaron el contenido de Zn en hojas y tallo de las plantas inoculadas con ambos aislamientos con excepción de la bacteria SER-23 en las hojas. Para este órgano el aporte de N causó la disminución en 10% de la absorción de Zn y para los tallos causó el incremento en 15% del contenido de este nutriente respecto a los tratamientos sin nitrógeno ( $P \leq 0,0253$ ).



**Figura 8.** Medias del contenido de zinc, contrastes ortogonales, análisis del efecto de nitrógeno, estudio de la tendencia lineal y análisis de varianza para las hojas y el tallo de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish), inoculados con aislamientos de *Bacillus cereus*, y como sustrato un suelo de la zona oeste de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera Nacional (CORBANA), Pococí, Limón, Costa Rica, 2020.

## Discusión

En una evaluación realizada por Ortega et al., (2022) se logró comprobar la capacidad de los aislamientos SER-23 y BF-98 para aumentar el crecimiento y el contenido de nitrógeno de diferentes órganos (cormo, tallo y hojas) de las plántulas de banano en suelos representativos del área de producción del cultivo de banano.

El incremento del contenido de zinc en las en hojas y tallos, junto al aumento de azufre en los tallos cuando se inocularon las bacterias SER-23 y BF-98, y el aumento observado de potasio para la cepa SER-23, demuestra que estos aislamientos tuvieron la capacidad de aumentar la absorción de nutrientes en las plantas inoculadas.

Este efecto de estimulación en la absorción de elementos Zn, S y K puede estar relacionado con la síntesis de compuestos orgánicos que permiten la oxidación de formas insolubles de estos elementos a formas solubles, la síntesis de enzimas y la formación de quelatos por parte de estas bacterias lo que se traduce en el suministro adicional de estos

nutrientes (Khatoon et al., 2020; Meena et al., 2017; Ruzzi & Aroca, 2015; Singh et al., 2011).

Las cepas SER-23 y BF-98 han demostrado propiedades beneficiosas para la promoción de crecimiento y el incremento en el contenido de nitrógeno en diferentes órganos (Ortega et al., 2022). Se ha asociado la capacidad de las BPCV con la síntesis de fitohormonas como el ácido indolacético, el cual estimula una mayor emisión de raíces absorbentes promoviendo la capacidad de absorción de agua y nutrientes (Ali & Khan, 2021; Mekonnen & Kibret, 2021; Shameer & Prasad, 2018). La mayor absorción por las plantas inoculadas con las cepas estudiadas se presentó en las plantas sembradas en los suelos de la zona este. Estos suelos contenían una mayor cantidad de P, K y Zn. Se podría indicar que esta condición favoreció la capacidad de los aislamientos para solubilizar una mayor cantidad de K y Zn, pero no de P.

Existe poca información sobre la aplicación de *B. cereus* en *Musa* sp. y su efecto en el contenido de nutrientes. En esta investigación, el aumento alcanzado en la absorción de hojas y tallos fue de un 15 al 18% para Zn. En los tallos el incremento fue de un 4 a 10% para el S y de un 3 a 10% en el caso del K. Dentro de los pocos estudios reportados Souza et al., (2016) encontró al evaluar en invernadero al cultivar Prata Anã (AAB) y un consorcio de *Bacillus* + *Lysinibacillus* sp.+ *Paenibacillus* sp. y otras bacterias, un incremento en el contenido total de K, S y Zn en un 22 a 75%, 2 a 36% y 10 a 55% respectivamente. Otra investigación desarrollada en campo con el cultivar Virupakshi (*Musa* AAB) al cual aplicaron *Pseudomonas fluorescens* en combinación con quitina reportó el aumento en el contenido de P y K en las hojas de 47 y 21% respectivamente (Kavino et al., 2010). En ambos casos las bacterias estudiadas se utilizaron en combinación con otros organismos o con un acarreador para favorecer la acción promotora sobre las plantas.

En el presente estudio, no se encontró respuesta a la inoculación de los aislamientos en ambos suelos cuando se aplicó una dosis superior a 33% N (8,48 mg semanales). Esto sugiere que una alta disponibilidad de nitrógeno influye de manera negativa en la actividad de los aislamientos. Correspondiendo con lo reportado por otros investigadores los cuales indican que una alta disponibilidad de nitrógeno puede inhibir la actividad de las bacterias, su capacidad de solubilizar nutrientes y de estimular su absorción (Baset Mia, Shamsuddin, & Mahmood, 2010). El suelo de la zona oeste alcanzó un contenido de nitrógeno 60% mayor al suelo del este. Esta diferencia pudo ser otro factor que disminuyó la capacidad de estas cepas para solubilizar nutrientes. En este sentido un alto aporte de fertilizante nitrogenado

proveniente de fertilizantes sintéticos o proveniente de una aplicación orgánica no madura podría inhibir la actividad de los aislamientos estudiados.

## **Conclusiones**

- La aplicación de los aislamientos BF-98 y SER-23 causaron una mayor absorción de zinc en las hojas y tallos de las plantas que crecieron en los suelos provenientes de la zona este de producción. Estos aislamientos también lograron un incremento en la absorción de potasio y azufre en los tallos de plantas también de la zona este.
- Las cepas estudiadas no lograron aumentar la absorción de K, Zn, S y P en las plantas inoculadas y que crecieron en los suelos de la zona oeste. Lo anterior demuestra que las condiciones de los suelos son fundamentales para un proceso exitoso de la colonización de la rizosfera.
- El procedimiento utilizado para evaluar estos aislamientos se considera adecuado, permitiendo la selección de candidatos con potencial de ser evaluados como BPCV. En este sentido los candidatos evaluados permiten continuar con evaluaciones en campo.
- Una disponibilidad de nitrógeno superior a 8,48 mg semanales podría causar la inhibición de capacidad de solubilizar Zn, S y K de las bacterias estudiadas.

## **Recomendaciones:**

El procedimiento de evaluación de candidatos a BPCV demostró ser efectivo, se recomienda continuar evaluando candidatos ya que en la actualidad se tiene pocos aislamientos con estas propiedades. Futuras evaluaciones pueden considerar la utilización de consorcios bacterianos como una forma de aumentar las posibilidades de éxito al combinar diferentes organismos y estímulos.

Se debe continuar con una fase de campo la cual permite evaluar la viabilidad de los aislamientos utilizados en condiciones más extremas y sometidos a la competencia con otras comunidades de microorganismos. La investigación debe estar acompañada con el uso de acarreadores como compost, biocarbón u otro sustrato que aumente la posibilidad de adaptación de los aislamientos utilizados.

## Referencias

- Ali, S., & Khan, N. (2021). Delineation of mechanistic approaches employed by plant growth promoting microorganisms for improving drought stress tolerance in plants. *Microbiological Research*, 249, Article 126771. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126771>
- Baset Mia, M. A., Shamsuddin, Z. H., & Mahmood, M. (2010). Use of Plant Growth Promoting Bacteria in Banana: A New Insight for Sustainable Banana Production. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(3), 459–467.
- Basu, S., Rabara, R., & Negi, S. (2017). Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. *Plant Gene*, 12, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.004>
- Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Selvakumar, G., & Sundaram, S. P. (2015). Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*, 95, 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.05.011>
- Corporación Bananera Nacional. (2022, enero). *Estadísticas de producción 2021*. Sección de Estadísticas. <https://www.corbana.co.cr/banano-de-costa-rica-2/#>
- Côte, F., Tomekpe, K., Staver, C., Depigny, S., Lescot, T., & Markham, R. (2010). Agro-ecological intensification in banana and plantain (*Musa* spp.): an approach to develop more sustainable cropping systems for both smallholder farmers and large-scale commercial producers. *Acta Horticulturae*, 879, 457–463. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.879.50>
- Díaz-Romeu, R., & Hunter, A. (1978). *Metodología de muestreo de suelos, análisis químico de suelos y tejido vegetal e investigación en invernadero*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. <https://bit.ly/3B1lxAj>
- Ferreira, C. M. H., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2019). Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of The Total Environment*, 682, 779–799. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.225>
- Gerszon, M., Hill, R., Lakner, C., Wu, H. & Yoshida, N. (1 de abril de 2022). *Pandemia, precios y pobreza*. Banco Mundial. <https://blogs.worldbank.org/es/opendata/pandemia-precios-y-pobreza>

- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50(3), 346–363. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
- Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D., & Samiyappan, R. (2010). Effect of chitinolytic PGPR on growth, yield and physiological attributes of banana (*Musa spp.*) under field conditions. *Applied Soil Ecology*, 45(2), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.02.003>
- Khatoon, Z., Huang, S., Rafique, M., Fakhar, A., Kamran, M. A., & Santoyo, G. (2020). Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. *Journal of Environmental Management*, 273, Article 111118. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111118>
- Lenth, R., Buerkner, P., Herve, M., Love, J., Miguez, F., Riebl, H., & Singmann, H. (2021). *Estimated marginal means, aka least-squares means*. R Foundation for statistical computing. <https://bit.ly/3S02fCO>
- López, A., & Espinosa, J. (1995). *Manual de nutrición y fertilización del banano*. International Plant Nutrition Institute, & Corporación Bananera Nacional. <https://bit.ly/3czzr4oY>
- Meena, V. S., Meena, S. K., Verma, J. P., Kumar, A., Aeron, A., Mishra, P. K., Bisht, J. K., Pattanayak, A., Naveed, M., & Dotaniya, M. L. (2017). Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. *Ecological Engineering*, 107, 8–32. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.06.058>
- Mehlich, A. (1984). Mehlich 3 Soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. *Communications In Soil Science Plant Analysis*, 15(12), 1409–1416. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00103628409367568>
- Mekonnen, H., & Kibret, M. (2021). The roles of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable vegetable production in Ethiopia. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8, Article 15. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00213-y>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020). Análisis del mercado del banano: resultados preliminares 2019. In *Panorama general de febrero de 2020*. <http://www.fao.org/3/ca9212es/ca9212es.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021). *Codex Alimentarius*. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/>

- Ortega, R., Torres, P., Segura, R., Echeverría, F., & Uribe, L. (2022). Aislamientos de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento y el contenido de nitrógeno en banano (*Musa AAA*). *Agronomía Mesoamericana*, 49614. <https://doi.org/10.15517/am.v33i3.49614>
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Eispack, A., Heisterkamp, S., Van Willigem, B., Ranke, J., & R Core Team. (2020). *nlme: Linear and nonlinear mixed effects models* (R package version 3.1-148). R Foundation for statistical computing.
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing* (R 3.6.3). R Foundation for Statistical Computing. <https://bit.ly/3ojkGEY>
- Rodríguez Morales, A. (2014). *Evaluación del efecto de cepas nativas de bacillus sp., aisladas de un suelo supresivo a nemátodos, sobre el nematodo barrenador banano, Radopholus similis (Thorne), y el crecimiento de plantas de banano (Musa AAA) bajo condiciones de vivero* [Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. Repositorio del Tecnológico de Costa Rica. <https://bit.ly/3zlqOCL>
- Ruzzi, M., & Aroca, R. (2015). Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.042>
- Shameer, S., & Prasad, T. N. V. K. V. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84, 603–615. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0365-1>
- Singh, J. S., Pandey, V., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140(3–4), 339–353. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017>
- Souza, G. L. O. D., Nietsche, S., Xavier, A. A., Costa, M. R., Pereira, M. C. T., & Santos, M. A. (2016). Triple combinations with PGPB stimulate plant growth in micropropagated banana plantlets. *Applied Soil Ecology*, 103, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.03.001>
- Thomas, G. W. (1983). Exchangeable cations. In A. L. Page (Ed.), *Methods of soil analysis: Part 2 chemical and microbiological properties*, 9.2.2. (2nd ed., pp. 159–165). American Society of Agronomy, Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c9>



United States International Trade Commission. (2020). *Global economic impact of missing and low pesticide maximum residue* (Vol 1). <https://www.usitc.gov/publications/332/pub5071.pdf>

Voegele, J. (2022, Julio). *Fertilizantes: Cómo gestionarlos para evitar una crisis alimentaria prolongada*. Banco Mundial Blogs. <https://blogs.worldbank.org/es/voices/como-gestionar-los-fertilizantes-en-el-mundo-para-evitar-una-crisis-alimentaria-prolongada>

Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1), 29–38. <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>

## 6. Discusión Global

El incremento del peso seco que mostraron las plantas inoculadas con los aislamientos BF-98 y SER-23 demuestra que estas bacterias tienen propiedades para mejorar el crecimiento. No está claro el mecanismo por el cual los aislamientos utilizados provocaron este mayor crecimiento, pueden ser varios los factores responsables.

Por ejemplo, algunos autores atribuyen la estimulación en el crecimiento ocurrida en las plantas a la síntesis de fitohormonas y la acción promotora de crecimiento que producen las bacterias presentes en la rizosfera (Basu et al., 2017; Chauhan et al., 2015; Lobo et al., 2019). El mayor crecimiento en las plantas inoculadas pudo deberse a una abundancia de nitrógeno encontrado en las hojas y pseudotallos como consecuencia de la fijación biológica realizada por las bacterias.

Es conveniente considerar que factores edáficos pueden afectar tanto el crecimiento de las plantas como el comportamiento de los aislamientos. Así, las condiciones del suelo demostraron ser un factor determinante en la capacidad de las bacterias para expresar sus propiedades. La zona este de producción presentó mayor fertilidad, menor acidez extractable y mayores contenidos de arcilla, estos factores pudieron promover el crecimiento de las plantas inoculadas con el aislamiento SER-23.

De igual forma, una baja disponibilidad de nitrógeno parece ser el factor que más pudo favorecer el efecto estimulante de la cepa SER-23. Lo que se comprobó al no encontrar un efecto promotor al adicionar cantidades de nitrógeno superiores a los 8,48 mg semanales. Esta dependencia debe considerarse como un factor determinante en este

aislamiento ya que un suelo con altos contenidos de nitrógeno o el aporte constante de este elemento podría inhibir la actividad de la bacteria.

La promoción de crecimiento alcanzado por BF-98 en el suelo oeste a la dosis de 8,48 mg semanales parece comprobar que este aislamiento requiere de una cierta cantidad inicial de nitrógeno para promover la ganancia de peso. Este comportamiento se desvía del mostrado por SER-23 en el suelo del este.

La aplicación de cantidades superiores a 8,48 mg semanales de N no logró causar cambio en el peso seco. La inhibición de la capacidad de las bacterias para causar la promoción de crecimiento por efecto de la disponibilidad de nitrógeno ha sido previamente señalada (Baset Mia, Shamsuddin, Wahab, et al. 2010). Estos autores reportaron una disminución en la capacidad de las bacterias de fijar nitrógeno al aumentar la disponibilidad de nitrógeno en el sustrato.

Los aislamientos bacterianos BF-98 y SER-23 incrementaron el contenido de N en todas las estructuras de la planta. El aumento en el tenor de N en diferentes órganos luego de la inoculación puede ser la confirmación de la capacidad de fijación de N por parte de estas cepas estudiadas (Singh et al., 2020).

El incremento del contenido de zinc en las en hojas y tallos, junto con al aumento de azufre y potasio en los tallos cuando se inocularon las bacterias SER-23 y BF-98 demuestra que estos aislamientos tuvieron la capacidad de aumentar la absorción de nutrientes en las plantas inoculadas.

Una las propiedades de algunas BPCV es la síntesis de pequeñas cantidades de fitohormonas, como el ácido Indolacético, el cuál estimula la emisión de raíces o pelos absorbentes que tienen la capacidad de absorción de agua y nutrientes (Ali & Khan, 2021; Mekonnen & Kibret, 2021; Shameer & Prasad, 2018). No se logró comprobar una mayor cantidad de raíces en las plantas inoculadas en esta investigación. Sin embargo, dada la dificultad de poder evaluar la producción de raíces finas y pelos absorbentes, no se descarta que la acción de estos aislamientos pudo favorecer la capacidad de las plantas inoculadas de absorber agua y nutrientes.

Se ha reportado que algunos géneros de bacterias pueden emitir pequeñas cantidades de compuestos orgánicos los cuales oxidan las formas no disponibles de Zn, S y K a formas solubles. Al mismo tiempo que realizan procesos como la síntesis de enzimas y la producción de moléculas complejas como quelatos los cuales significan un aporte adicional de nutrientes (Khatoon et al., 2020; Meena et al., 2017; Ruzzi & Aroca, 2015;

Singh et al., 2011). Estos procesos pueden ser los responsables del mayor contenido de estos elementos en los órganos de las plantas inoculadas.

Por otra parte, el mayor contenido inicial de nutrientes de los suelos fue una condición que pareció afectar también la capacidad de los aislamientos de aumentar la disponibilidad de nutrientes y su absorción. Ejemplo son los suelos de la zona este de producción los cuales contenían una mayor reserva de P, K y Zn. Esta condición pudo causar una mayor solubilización de nutrientes favoreciendo su absorción por las plantas.

En ambos experimentos no se encontró respuesta a la aplicación de los aislamientos SER-23 y BF-98 cuando se aplicó una dosis de 66% de N o superior. La mayor cantidad de nitrógeno afectó la capacidad de los aislamientos para aumentar el contenido de nitrógeno, potasio, azufre y zinc en los diferentes órganos de la planta.

La disponibilidad de nitrógeno en el sustrato parece ser un factor determinante en la capacidad de los aislamientos estudiados para fijar nitrógeno atmosférico y promover el crecimiento. Varios investigadores han observado que una alta disponibilidad de nitrógeno inhibió la actividad de las bacterias estudiadas y su capacidad de solubilizar nutrientes y estimular su absorción (Baset Mia, Shamsuddin, & Mahmood, 2010).

Los resultados de esta investigación pueden significar un primer aporte para las futuras iniciativas que tengan como objetivo aumentar la sostenibilidad en la producción de alimentos que debe estar orientada al cumplimiento de los objetivos del desarrollo sostenible.

La supervivencia del ser humano depende de la utilización de los recursos naturales y del ambiente. El progreso económico y social no debe ser sinónimo de contaminación y destrucción del ambiente, ya que nuestro destino está ligado al uso que damos a los recursos que posee el planeta. La destrucción acelerada y la sobreexplotación de estos ponen en peligro la supervivencia de las futuras generaciones. La ciencia y tecnología debe tener como un objetivo permanente el desarrollo de técnicas que disminuyan al máximo el impacto de nuestras actividades.

Los líderes mundiales aprobaron la adopción de un conjunto de objetivos globales cuya finalidad fue el de marcar una ruta a través de la cooperación mundial para alcanzar el desarrollo sostenible de las naciones y asegurar la prosperidad para todos. Los involucrados en este proceso son los gobiernos, el sector privado, la sociedad civil y las personas (Naciones Unidas 2015). Los objetivos de este proyecto de investigación podrían incluirse en varios de los objetivos del desarrollo sostenible.

La producción de las bacterias promotoras de crecimiento puede convertirse en una mejora en tecnología disponible en la producción de alimentos reduciendo la utilización de insumos sintéticos y fertilizantes los cuales tienen efectos acumulados en el ambiente. La producción y consumo responsable consiste en hacer más con menos, es volverse más eficiente, en este concepto el uso de bacterias podría aportar mucho a la mejora de los rendimientos en la producción de alimentos, la resiliencia de los cultivos y su adaptación al cambio climático. Siendo parte del objetivo 12 del desarrollo sostenible.

La producción de alimentos está en riesgo debido al cambio climático, según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, las sequías más largas e intensas y el calentamiento de los océanos afectan la productividad de los cultivos, la ganadería y pesca. La solución es la agricultura sostenible, la adaptación, investigación y el aumento de la resiliencia de los sistemas agrícolas (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2023). El uso de las bacterias es el primer paso en el desarrollo de una nueva agricultura sostenible en la cual los cultivos sean seleccionados no solo por sus rendimientos, también por su adaptación y resiliencia

La aplicación de fertilizantes nitrogenados y su relación con la formación de óxido nitroso representa una importante contribución dentro de los gases efecto invernadero. La mayoría de los fertilizantes son traídos de Asia y Europa, su transporte causa una huella de carbono. Ambas contribuciones a la emisión de gases efecto invernadero serían disminuidas si estos fertilizantes fueran sustituidos en parte por un fertilizante verde local.

Esto puede significar la disminución en la utilización de miles de toneladas de fertilizantes nitrogenados que son aplicados todos los años. Su empleo podría beneficiar a la producción de alimentos en agroecosistemas convencionales como en sistemas de subsistencia (baja cantidad de insumos). Realizando una importante acción en beneficio del clima siendo este otro de los objetivos del desarrollo sostenible que se encuentran dentro de los alcances de este proyecto de investigación.

Los fertilizantes nitrogenados son muy solubles y sufren escorrentía moviéndose como nitratos hacia las vías y cuerpos de agua. La disminución en el uso de fertilizantes, sintéticos y agroquímicos reducirá la liberación de sustancias con efectos nocivos a los ambientes acuáticos y marinos causantes de procesos como la eutrofización, la disminución del oxígeno y muerte de la biota acuática. Se estará disminuyendo la presión sobre estos ambientes, se protege la diversidad del microbioma, la cual es esencial para mantener el equilibrio entre poblaciones coexistentes de un mismo hábitat. De esta forma el uso de

bacterias promotoras de crecimiento ayuda al cumplimiento de los objetivos de protección de la vida submarina y vida de ecosistemas terrestres (objetivos 14 y 15 respectivamente).

La salud de los trabajadores encargados de la aplicación de fertilizantes es otro factor que podría verse beneficiada al disminuir la cantidad de fertilizantes a utilizar. El uso de estas sales concentradas requiere un equipo de protección básico para prevenir el contacto directo con estas sustancias las cuales son irritantes y pueden causar la afectación de la piel por contacto o respirar el polvo y vapores desprendido por ellos.

Según las Naciones Unidas (2023) existen cerca de 250 millones de personas que se podrían encontrar al borde de la hambruna. Esto como consecuencia de los conflictos sociales, cambio climático y las recesiones económicas en países tercermundistas. En estas circunstancias los recursos son muy escasos y las condiciones de producción muy inhóspitas, la producción de alimentos con escasa cantidad de insumos y cultivos resilientes es necesaria. La utilización de las bacterias promotoras de crecimiento en cultivos de alta resiliencia y adaptados a condiciones de baja cantidad de insumos, fertilizante y agua puede ser una forma de contribución al objetivo número 2 hambre cero de los objetivos del desarrollo sostenible.

La investigación actual debe estar orientada en el desarrollo sostenible y en varios de sus objetivos los cuales fueron desarrollados para lograr el bien común. Los resultados de esta investigación son un paso en el desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de una agricultura adaptada a las condiciones ambientales ocasionadas por el cambio climático y por la necesidad de cultivos capaces de mantenerse altamente productivos a pesar de presentar condiciones no ideales para su crecimiento. Esto es contrario a la forma convencional de producción de alimentos la cual está basada en los principios de la revolución verde, cuyo objetivo es alcanzar los mayores rendimientos con el uso de una alta cantidad de insumos sintéticos y la modificación del ambiente. El objetivo de la nueva agricultura sostenible es la disminución en el uso de estos insumos. La nueva agricultura sostenible debe estar fundamentada no en alcanzar el máximo rendimiento productivo, pero si en lograr el menor impacto sobre el ambiente.

## **7. Conclusiones globales:**

La inoculación de las cepas BF-98 y SER-23 causó el aumento de materia seca en las plantas de banano. Esta promoción en el crecimiento se redujo en respuesta al incremento en el aporte de nitrógeno inorgánico.

La inoculación de los aislamientos BF-98 y SER-23 elevó el contenido de N en todos los órganos de la planta. Estas cepas incrementaron también la absorción de Zn en hojas y tallos, del K en los tallos de ambas zonas y S en los tallos de la zona este.

Incrementar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo afectó de forma negativa la capacidad de los aislamientos estudiados para lograr la promoción de crecimiento y el aumento en el contenido de nutrientes N, K, Zn y S.

Los suelos bananeros pueden ser una fuente de microorganismos con potencial para ser utilizados como promotores de crecimiento vegetal, fijadoras de nitrógeno y solubilizadores de potasio, zinc y azufre.

El procedimiento utilizado para evaluar estos aislamientos fue similar al utilizado en otros proyectos de prospección de BPCV. El mismo permitió la selección de candidatos con potencial para ser considerados como BPCV estos podrán continuar siendo evaluados en condiciones de campo

Los resultados alcanzados permiten concluir que aún existe potencial que estudiar en la microbiología presente en los suelos de los sistemas agrícola bananeros. Esto representa un paso más para lograr un cambio en la forma de producción actual y futura en búsqueda de una producción más sostenible.

## **8. Recomendaciones**

Llevar a cabo programas de prospección de candidatos a BPCV. Estos programas deben contemplar la creación de colecciones de los aislamientos para su preservación y protección, así como la evaluación de los candidatos.

Las futuras evaluaciones deben incluir la interacción con otros organismos ya que la solución o la búsqueda de una agricultura sostenible no dependerá de un solo organismo sino de la combinación de varios organismos o consorcios de estos BPCV las cuales puedan adaptarse a las condiciones del ambiente y potenciar su supervivencia.

Los candidatos a ser BPCV deben presentar una serie de características como la tolerancia a ciertos agroquímicos utilizados en la industria siendo importante la realización de pruebas en campo que permitan evaluar el comportamiento y la adaptación de estos aislamientos.

Se recomienda el desarrollo de pruebas con técnicas moleculares que permitan determinar poblaciones tanto del inóculo inicial como en el campo posterior a su inoculación. Esto permite la obtención de información sobre la abundancia o la ausencia del organismo de interés y si es necesaria aplicaciones sucesivas de estas BPCV.

El empleo de BPCV debe estar acompañado de una serie de cambios en los sistemas productivos que permitan la supervivencia de estos organismos. Nuevas prácticas culturales deben ser adaptadas y una disminución en el uso de fertilizantes nitrogenado es fundamental para el éxito.

## 9. Referencias.

- Ateş, Ö & Kivanç, M. (2020). Isolation of ACC deaminase producing rhizobacteria from wheat rhizosphere and determining of plant growth activities under salt stress conditions. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18(4), 5997–6008. [https://doi.org/10.15666/aeer/1804\\_59976008](https://doi.org/10.15666/aeer/1804_59976008)
- Banco Mundial. (2023, Abril). Actualización sobre la seguridad alimentaria. <https://www.bancomundial.org/es/topic/agriculture/brief/food-security-update>
- Bakhshandeh, E., Gholamhosseini, M., Yaghoobian, Y., & Pirdashti, H. (2020). Plant growth promoting microorganisms can improve germination, seedling growth and potassium uptake of soybean under drought and salt stress. *Plant Growth Regulation*, 90(1), 123–136. <https://doi.org/10.1007/s10725-019-00556-5>
- Comisión Europea. (2023, Abril). *Seguridad Alimenticia*. [https://food.ec.europa.eu/index\\_en](https://food.ec.europa.eu/index_en)
- Corporación Bananera Nacional. (2021, Abril). *Estadísticas de producción*. <https://www.corbana.co.cr/banano-de-costa-rica-2/#estadistica>
- Corporación Bananera Nacional. (2022, Enero). *Estadísticas de producción 2021*. Sección de Estadísticas. <https://www.corbana.co.cr/banano-de-costa-rica-2/#>
- Kanwal, S., Ilyas, N., Batool, N., & Arshad, M. (2017). Amelioration of drought stress in wheat by combined application of PGPR, compost, and mineral fertilizer. *Journal of Plant Nutrition*, 40(9), 1250–1260. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1263322>
- Martínez, G., Pargas, R., & Manzanilla, E. (2012). Orden Zingiberales: las musáceas y su relación con plantas afines. *Agronomía Tropical*, 62, 171–178. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-192X2012000100014&nrm=iso](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2012000100014&nrm=iso)
- Méndez, A., Cortazar, E., Guevara E., Ceballos, O., Rodríguez, B., Kie, A., Hernández, O., Guerrero, J., & Reverchon, F. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through

volatile emissions. *PloS One*, 13(3), e0194665–e0194665.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194665>

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2015). *Cambio Climático: Mitigación. Guía resumida del quinto informe de evaluación del IPCC Grupo de trabajo III*. [https://www.miteco.gob.es/images/es/guia-resumida-qt3-mitigacion-ar5\\_tcm30-177779.pdf](https://www.miteco.gob.es/images/es/guia-resumida-qt3-mitigacion-ar5_tcm30-177779.pdf)

Naciones Unidas. 2023. *La agenda para el desarrollo sostenible*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/development-agenda/>

Naciones Unidas. (2023, Abril). *Acción por el clima. ¿Qué es el cambio climático?* <https://www.un.org/es/climatechange/what-is-climate-change>

Naciones Unidas. (2023, Abril). Objetivo 2: Poner fin al hambre. Hambre Cero. *Objetivos del desarrollo sostenible*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/hunger/>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1996). *Cumbre mundial sobre la alimentación. Enseñanzas de la revolución verde: hacia una nueva revolución verde*. <https://www.fao.org/3/w2612s/w2612s06.htm>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2009). *La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050*. [https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues\\_papers/Issues\\_papers\\_SP/La\\_agricultura\\_mundial.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf)

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). *Bananas World Exports*. <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/tropical-fruits/en/>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018, Junio). *Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta*. <https://www.fao.org/news/story/es/item/1141818/icode/>

Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (2020). Análisis del mercado del banano: resultados preliminares 2019. In *Panorama general de febrero de 2020*. <http://www.fao.org/3/ca9212es/ca9212es.pdf>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2023. Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos. <https://www.fao.org/sustainable-development-goals/goals/goal-13/es/>



- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2023. Pesticidas. *Codex alimentarius*. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/thematic-areas/pesticides/en/>
- Pattison, T., Smith, L., Moody, P., Armour, K., Badcock, J., & Cobon, J. (2005). Proyecto sobre salud del suelo y raíces de banano - Australia. In D. Turner & F. Rosales (Eds.), *Banana Root System: towards a better understanding for its productive management*. [https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user\\_upload/online\\_library/publications/pdfs/1097.pdf](https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/1097.pdf)
- Robinson, J. C., & Galán Saúco, V. (2012). *Plátanos y bananas*. Ediciones Mundi-Prensa. <https://books.google.co.cr/books?id=mAv3EQAcgZ8C>
- Rosales, F., Pocasangre, L., Trejos, J., Serrano, E., & Peña, W. (2007). *Guía de diagnóstico para salud y calidad de suelos bananeros* (F. Rosales, Ed.; primera). Biodiversity International.
- Serrano, E. (2005). Relationship between functional root content and banana yield in Costa Rica. In D. Turner & F. Rosales (Eds.), *Banana Root System: towards a better understanding for its productive management*. INIBAP. [https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user\\_upload/online\\_library/publications/pdfs/1097.pdf](https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/1097.pdf)
- Soto, M. (2014). *Bananos. Conceptos básicos, Tomo I* (primera, Vol. 1). Tecnológico de Costa Rica.
- Sun, J., Zou, L., Li, W., Wang, Y., Xia, Q., & Peng, M. (2018). Soil microbial and chemical properties influenced by continuous cropping of banana. *Scientia Agricola*, 75(5), 420–425. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0503>
- Suzuki, E. (2019, July 8). *La población mundial seguirá aumentando hasta llegar a casi 10 000 millones de habitantes en 2050*. Banco Mundial. Blog de Datos. <https://blogs.worldbank.org/es/opendata/la-poblacion-mundial-seguira-aumentando-hasta-llegar-a-casi-10000-millones-de-habitantes-en-2050#:~:text=Blog%20de%20Datos-,La%20poblaci%C3%B3n%20mundial%20seguir%C3%A1%20aumentando%20hasta%20llegar%20a%20casi,millones%20de%20habitantes%20en%202050mundial> }

United States International Trade Commission. (2020). *Global Economic Impact of Missing and Low Pesticide Maximum Residue*. (Vol1).  
<https://www.usitc.gov/publications/332/pub5071.pdf>.

Wang, L., & Li, X. (2019). Steering soil microbiome to enhance soil system resilience. *Critical Reviews in Microbiology*, 45(5–6), 743–753.  
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1700906>