



## 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 in 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>

<sup>1</sup> Recepción: 5 de enero, 2022. Aceptación: 28 de marzo, 2022. 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 (autor para correspondencia; <https://orcid.org/0000-0002-4704-4831>), ptorres@corbana.co.cr (<https://orcid.org/0000-0002-2378-1749>), 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 (<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 (<https://orcid.org/0000-0002-8276-7824>).

## 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 simultáneos entre abril y septiembre 2020, en el Centro de Investigaciones de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), La Rita, Limón, Costa Rica. Se inocularon cuatro aislamientos de *B. cereus* en plantas de banano a las cuales se les fertilizó con cuatro dosis de nitrógeno semanalmente. 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 1: las plantas inoculadas con el aislamiento SER-23 presentaron el mayor peso seco total. En el experimento 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 de *Bacillus cereus* 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 plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) could be used as an alternative source to the use of conventional nitrogen fertilizers in banana (*Musa AAA*) cultivation. It is necessary to search for bacteria adapted to Costa Rican soil conditions and banana cultivation. **Objective.** To evaluate the effect of the inoculation of four *Bacillus cereus* isolates on the growth and nitrogen (N) content of banana seedlings under greenhouse conditions. **Materials and methods.** Two simultaneous experiments were carried out between April and September 2020 at the Corporacion Bananera Nacional (CORBANA) Research Center, La Rita, Limon, Costa Rica. Four isolates of *B. cereus* were inoculated into banana plants that were fertilized with four doses of nitrogen 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 consisted of the bacterial isolates and the control. The variables measured were plant height, chlorophyll content, leaf area of the third leaf, fresh and dry weight of roots, corm, pseudostem, and leaves, as well as the nitrogen content in each organ. **Results.** In experiment 1: the plants inoculated with the SER-23 isolate presented the highest total dry weight. In experiment 2: the highest total dry weight was observed in seedlings inoculated with the BF-98 isolate. The application of SER-23 and BF-98 bacteria significantly increased the nitrogen content in all the organs evaluated. **Conclusions.** The inoculation of *Bacillus cereus* isolates SER-23 and BF-98 stimulated the increase in biomass and nitrogen content in banana plants, this increase depended on the nitrogen availability and soil type.

**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 9700 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 y plaguicidas). Dicho modelo se estableció bajo un esquema de manejo intensivo para lograr altas producciones (monocultivo, mejoramiento genético, regadío y altas densidades). 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., 2015).

El uso prolongado de altas cantidades de fertilizantes nitrogenados amoniacales provoca en el suelo el aumento de la acidez, pérdida y desbalance de bases, 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 Mía, 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; Ruzzi & Aroca, 2015; Shameer & Prasad, 2018; Singh Meena et al., 2017).

El género *Bacillus* es uno de los grupos más estudiados por su gran abundancia en una diversidad de 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 relacionadas 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 doscientos aislamientos pertenecientes a veinte 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 (Côte et al., 2010; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura & Organización Mundial de la Salud, 2021; United States 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 rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) tienen una limitada capacidad de adaptación en ambientes diferentes al de su origen y una baja tasa de supervivencia durante su proceso de preservación. La selección de organismos con mayor capacidad de supervivencia 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 m s.n.m. 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 cmol (+) L<sup>-1</sup>, mientras que el suelo de la zona oeste (Experimento 2), tenía 15 cmol (+) L<sup>-1</sup>, 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 h.

**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), Pococi, Limon, Costa Rica, 2020.

Parámetros	Este	Oeste
Materia orgánica (%)	3,7	5,9
pH	6,5	5,9
Al <sup>3+</sup> (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
Σ' bases (cmol(+)l <sup>-1</sup> )	32	16
Arcilla (%)	33	8
Limo (%)	40	28
Arena (%)	27	63
Textura suelo	Franco arcilloso	Franco arenoso

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<sup>3+</sup> se determinaron con el método de Thomas (1983). El porcentaje de materia orgánica se realizó de acuerdo con la metodología de Walkley & Black (1934).

## 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 Morales, 2014).

Para la reactivación de los aislamientos, se utilizó el procedimiento empleado por el LCB y descrito por Rodríguez Morales (2014). Las rizobacterias se conservaron en placas con agar nutritivo (AN) a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 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 se sellaron e incubaron por 48 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una vez reactivado cada aislamiento, se colocó en una matriz líquida compuesta por  $5\text{ g L}^{-1}$  de peptona proteasa y  $3\text{ g L}^{-1}$  de extracto de carne a  $\text{pH} = 7$ . La suspensión bacteriana se mantuvo en agitación por cuatro días a 150 rpm y  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al finalizar el período de incubación, se realizó un control de calidad de la suspensión, para lo cual se inoculó  $25\text{ }\mu\text{L}$  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  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . 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 veinte tratamientos, los cuales se presentan en el Cuadro 2.

**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), Pococi, Limon, 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-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

RPCV: rizobacteria promotora de crecimiento vegetal. / RPCV: plant growth promoting rhizobacteria.

## 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 y 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  $\mu\text{g}$ . 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 una vez por semana. Se eliminaron las hojas bajas senescentes, brotes secundarios y tejido con síntomas de sigatoka negra.

### **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. Asimismo, se realizó la medición del índice de área foliar según la fórmula  $\text{IAF} = \text{largo} \times \text{ancho} \times 0,08 \times N^\circ \text{ hojas} \times 0,0662$  ( $N^\circ=1$ ) (Murray, 1960). Tanto la medición de la clorofila como el área foliar, se realizaron en la hoja número tres (hoja expandida, 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 dieciséis semanas de trasplante y el segundo a las diecisiete 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 de forma aleatoria 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 *clt* 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 observó 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 ( $P>0,05$ ).

Para el experimento sembrado con suelo de la zona este, e independiente 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 sí 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.

**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.** Means, contrast analysis, and linear trend study for plant height, leaf area index (IAF), and chlorophyll content, of banana (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) seedlings, inoculated with *Bacillus cereus* isolates in combination with four weekly doses of nitrogen, and using as substrate a soil from the eastern production zone of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococi, Limon, 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 ( $\mu\text{mol m}^2$ )	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.

### 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. Asimismo, a 0 % N, las plantas inoculadas con las cepas B-71, BF-98 y SER-217 y el testigo presentaron un PS similar.

**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 (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) seedlings, inoculated with *Bacillus cereus* isolates in combination with four weekly doses of nitrogen, and using as substrate a soil from the western production zone of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococi, Limon, Costa Rica, 2020.

Variable	% Nitrógeno	Aislamientos					± EE
		B-71	BF-98	SER-217	SER-23	Testigo	
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 ( $\mu\text{mol m}^2$ )	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

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 ( $P=0,0012$ ) (Figura 1). 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.

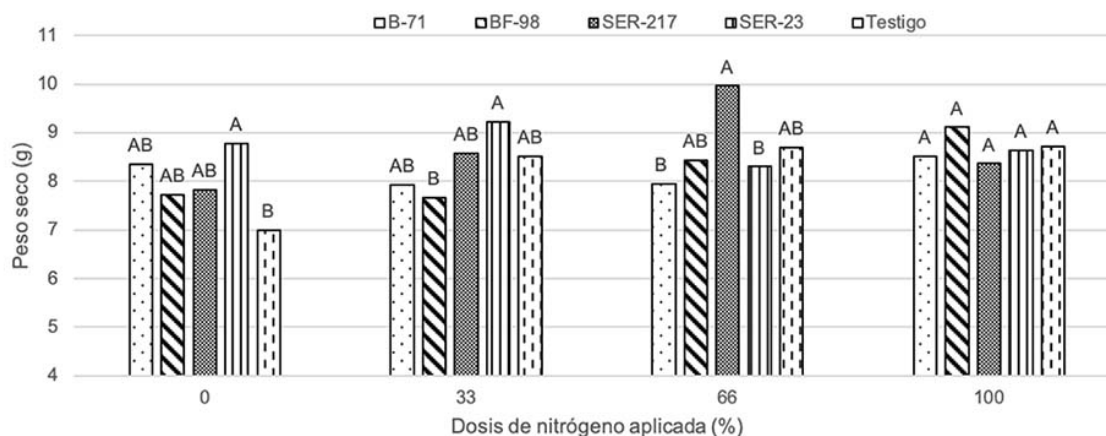
#### Suelo zona oeste

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

**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*, y 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 (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) seedlings inoculated with *Bacillus cereus* isolates, and using soil as substrate from the east and west production zone. National Banana Corporation (CORBANA), Pococi, Limon, 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



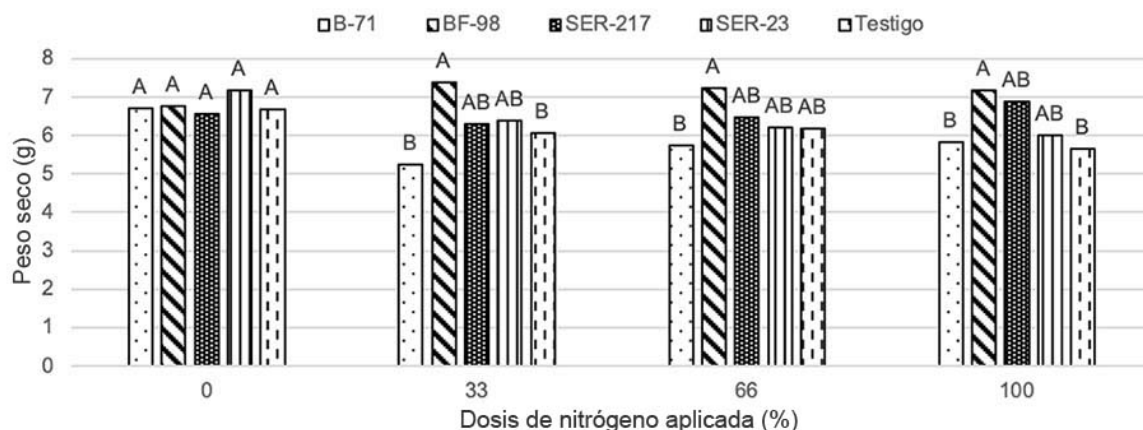
**Figura 1.** Peso seco total de plántulas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano, subgrupo Cavendish) inoculadas con aislamientos de *Bacillus cereus* en combinación con cuatro dosis de nitrógeno semanal y como sustrato un suelo de la zona este de producción del Caribe de Costa Rica. Corporación Bananera 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 (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) seedlings inoculated with *Bacillus cereus* isolates in combination with four weekly doses of nitrogen, and using soil from the Eastern Zone of production of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococi, Limon, Costa Rica, 2020.

Bars with a the same letter are not significantly different (N=10, Tukey, p>0.05).

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 con el 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.



**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 (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) seedlings inoculated with *Bacillus cereus* isolates in combination with four weekly doses of nitroge, and using soil as substrate from the western production zone of the Caribbean from Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococi, Limon, 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 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 ambas bacterias no se encontró en el contenido de nitrógeno de la raíz ( $P\geq 0,3876$ ). De manera general, todas las partes de la planta de banano incrementaron el contenido de nitrógeno a medida que

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

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 que se realizó el estudio, la inoculación con las bacterias BF-98 y SER-23 promovieron 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 ( $P \leq 0,0113$ ).

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,

**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), Pococi, Limón, Costa Rica, 2020.

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

Dosis (%)	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), Pococi, 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 (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) seedlings inoculated with *Bacillus cereus* isolates, and using as substrate a soil from the western production zone of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococi, Limon, 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.

**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 (*Musa* AAA cv. Gran Enano, Cavendish subgroup) seedlings inoculated with *Bacillus cereus* isolates, and using as substrate a soil from the western production zone of the Caribbean of Costa Rica. National Banana Corporation (CORBANA), Pococi, Limon, 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.

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 ( $P < 0,0006$ ).

## 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, los cuales es posible que promovieran 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 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 de la 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 de 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 de Araújo et al. (2021) con *B. thuringiensis* en el cultivar Prata Ana, incrementaron el peso seco de tallo (34 a 39 %), raíces (68 %) (Posada et al., 2016) y hojas (32 %) (de Araújo et al., 2021).

Plantas del cultivar Prata Catarina (AAAB) que 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 los experimentos realizados, 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 inhibitorio 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 y 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 Baset Mia, Shamsuddin y Mahmood (2010) y Masood et al. (2020), 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 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, para lo cual fue 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 probó la disminución en el porcentaje de contenido de nitrógeno en las hojas y luego en los pseudotallos. La mayor disponibilidad de nitrógeno en el suelo o un efecto dilución causado por el incremento de biomasa, pueden ser las principales causas de este resultado.

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, 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* (3<sup>rd</sup> 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/3B1IXAj>
- 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/3czr4oY>
- 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. (2<sup>nd</sup> 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>