

Evaluación del Efecto de los Microorganismos eficientes en el suelo usando Microscopía Electrónica de Barrido Analítica

E. Ramírez^a, J. L. Prin^b, L. Rojas de Astudillo^{a*}

^aDepartamento de Química. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre, Cumaná – Edo. Sucre, Venezuela.

^bInstituto de Investigación en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCAUDO), Cumaná – Edo. Sucre, Venezuela.

*Corresponding author, E-mail: lrojas40@yahoo.com, Tlf: +17862904438.

Recibido: 20-01-2022 Aceptado: 16-02-2022

Publicado: 31-03-2022

RESUMEN

Entre los usos de los denominados microorganismos eficientes (ME) está el del mejoramiento del estado nutricional de los suelos cultivables. Por lo que, en este estudio se evaluó el efecto de los ME en muestras de suelo inoculadas con ME cultivados en medio líquido (ME anaeróbicos) y en compost (ME aeróbicos). Para el análisis de las composiciones porcentuales de los elementos químicos, la morfología y el tamaño de las partículas, se usó la microscopía electrónica de barrido (MEB) con un detector de energía dispersiva de microanálisis de rayos X (EDX). Las semillas de *Solanum lycopersicum* sembradas en muestras de suelo con el tratamiento de ME aeróbico al 20% (aem20%) presentaron los mayores porcentajes de germinación de las semillas, y las plantas las mayores longitudes; estas muestras con sus controles fueron usadas para las evaluaciones por MEB y EDX. La textura en esas mismas muestras fue determinada por el método de la Pipeta. El porcentaje de carbono fue mayor y el de oxígeno menor en el suelo aem20%, posiblemente influenciados por los procesos microbianos que requieren alto niveles de oxígeno para su reproducción y crecimiento de la biomasa, incrementando los niveles de carbono orgánico. Los análisis por medio de MEB con EDX confirmaron el efecto de los ME en el suelo, en cuanto a textura y contenido de elementos químicos. Estos resultados muestran que se requieren más estudios a escalas micrométricas para evaluar las interacciones del sistema suelo-microorganismos y así poder entender su efecto en los procesos bioquímicos y biofísicos que ocurren en el suelo.

Palabras claves: Microorganismos aeróbicos, microorganismos eficientes, MEB, EDX, suelo agrícola, textura de suelo.

Evaluation of The Effect of effective Microorganisms in soil using Analytical Scanning Electron Microscopy

ABSTRACT

Among the uses of the so-called effective microorganisms (EM) is that of improving the nutritional status of cultivable soils. Therefore, in this study, the effect of ME in soil samples inoculated with ME grown in liquid medium (anaerobic ME) and in compost (aerobic ME) was evaluated. For the analysis of the percentage compositions of the chemical elements, morphology, and size of the particles, scanning electron microscopy (SEM) with an energy dispersive X-ray microanalysis (EDX) detector was used. *Solanum lycopersicum* seeds in soil samples with the 20% aerobic ME treatment (aem20%) presented the highest percentages of seed germination and the plants the longest lengths. These soil samples and that of a control soil were used for the SEM evaluations with EDX. The texture in these same samples was determined by the Pipette method. The percentage of carbon was higher and that of oxygen was lower in the soil aem20%, possibly influenced by microbial processes that require high levels of oxygen for their reproduction and biomass growth, increasing organic carbon levels. The analyzes by means of SEM with EDX confirmed the effect of the ME in the soil, in terms of texture and content of chemical elements. These results show that more studies at micrometric scales are required to evaluate the interactions of the soil-microorganism system and thus understand their effect on the biochemical and biophysical processes that occur in the soil.

Keywords: Aerobic microorganisms, effective microorganisms, SEM, EDX, agricultural, soil texture.

INTRODUCCIÓN

Los suelos son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres, incluido el control del clima, la cantidad y calidad del agua, el ciclo de nutrientes y el

hábitat de una inmensa biodiversidad [1]. En esa biodiversidad, las poblaciones microbianas en el suelo están inmersas en un marco de interacciones que impactan el desarrollo de las plantas y la calidad del suelo,

desempeñan muchas funciones y ofrecen muchos recursos, incluido el control de los ciclos geoquímicos, la remediación de la contaminación y el suministro de nuevos productos farmacéuticos [2,3,4]. Adicionalmente, la textura del suelo, como factor abiótico, influye en la retención y disponibilidad de nutrientes y en el contenido de agua, afectando así el entorno de vida y la actividad metabólica de los microorganismos [5,6,7]. Esto es debido a la variedad de tamaños de agregados, espacios porosos y gradientes químicos que da como resultado microhábitats (o nichos) altamente diversificados para los microbios del suelo, sugiriendo que la heterogeneidad de las partículas del suelo y su disposición estructural pueden explicar la biodiversidad, ya que conduciría a una mayor variedad de ambientes para los organismos [8, 9,10].

Si bien la biodiversidad en el suelo parece ser importante en términos de su cantidad y calidad, todavía no se conoce bien sobre la distribución de los organismos en el suelo y el impacto de la naturaleza antrópica o natural. Al contrario, los parámetros físicos y químicos están bien entendidos y fácilmente disponibles para los científicos y las partes interesadas, los cuales se utilizan comúnmente como indicadores de la calidad del suelo [11]. Por ello, en las investigaciones se ha incrementado el interés por estudiar las actividades de cooperación microbiana para ser explotadas como una biotecnología de bajo impacto y costo para contribuir con prácticas agro-tecnológicas sustentables y amigables con el ambiente [12].

Ante esta realidad, una de las alternativas que se presenta actualmente es la utilización de microorganismos eficientes (ME), tecnología desarrollada en la década de 1970 por T. Higa [13] que bien utilizada no afecta al ambiente, empleada por agricultores en la producción de sus cultivos de ME [14].

El medio de cultivo es preparado para que los inóculos de ME estén constituidos por la mezcla de varios microorganismos benéficos, entre ellos levaduras, actinomicetos, hongos filamentosos con capacidad

fermentativa y bacterias ácido lácticas y fotosintéticas, que son mutuamente compatibles entre sí y que coexisten en un cultivo [15,16,17].

Los ME tienen funciones importantes en el sector agrícola, entre ellas, la de acelerar la composición natural de la materia orgánica y promover el equilibrio de la flora microbiana que contribuye con el desarrollo de las plantas. Los ME son posibles sustitutos de los productos químicos y, por tanto, pueden favorecer la preservación del medio ambiente. Los ME se recolectan de suelos forestales fértiles a través de metodologías simples y económicas, para ser utilizada tanto por los agricultores a pequeña y a gran escala. Por lo que, la técnica de uso de ME es accesible y de bajo costo. Además, por ser fácil de preparar dentro de una propiedad, contribuye a la sustentabilidad de los sistemas agrícolas [18,19]. Estos hallazgos del uso de los ME han abierto una ventana de posibilidades de manejo de la actividad productiva del campo, por lo que su introducción en la agricultura como prácticas agroecológicas innovadoras hace necesario el desarrollo de investigaciones en ese campo. Tomando en consideración lo mencionado anteriormente, en este estudio se evaluó el efecto de los ME en muestras de suelo inoculadas con ME cultivados en medio líquido (ME anaeróbicos) y en compost (ME aeróbicos), por medio de la Microscopía Electrónica de Barrido analítica (MEB).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de suelo fueron extraídas del complejo agroecológico "Los Cautaros", municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela, en forma zigzag, a un nivel de profundidad de 20 cm. Seguidamente, las muestras secadas a temperatura ambiente se unieron, se homogenizaron y se tamizaron usando un tamiz de 2mm de diámetro, para luego ser usadas como muestras controles y en los tratamientos con los ME cultivados en medios aeróbicos y anaeróbicos.

Determinación de la textura del suelo

Se usó el método de la pipeta [20]. El procedimiento se aplicó a la fracción de suelo menor a 2 mm. De fundamental importancia en este análisis es el pretratamiento de las muestras, para conseguir la dispersión total de las partículas primarias. Por lo tanto, los materiales cementantes como la materia orgánica y el carbonato de calcio fueron previamente eliminados. La obtención de fracciones se fundamenta en la sedimentación de partículas en suspensión a una determinada profundidad y tiempos controlados. Para clasificar las partículas del suelo y denominar sus características texturales, fue utilizado el sistema propuesto por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. De acuerdo con este sistema, los intervalos del diámetro de partícula que corresponde a cada fracción de suelo son los siguientes: entre 2,0-0,05 mm para arenas; entre 0,05- 0,002 mm de limo y menor de 0,002 mm para arcillas. Las características de textura se pueden expresar de dos formas: representando el porcentaje de arena, limo y arcilla o haciendo referencia a la clase textural que corresponde a estos porcentajes.

Preparación de los tratamientos en las muestras de suelos con microorganismos eficientes

Para la colecta de los ME se seleccionó una composición importante de mantillo encontrado en la capa superficial (0 a 5 cm) de suelos húmedos tipo fértil, de bosques húmedos tropicales de dos localidades: Río Brito y La Montañita, en el estado Sucre, que contendrían los ME nativos, cuyos principales constituyentes recabados fueron hongos y bacterias adheridos a la materia orgánica en descomposición.

La reproducción de los ME se realizó primeramente bajo fermentación anaeróbica [17]. Se tomaron 10 kg de mantillo de bosque, tanto de Río Brito como de La Montañita, que contenían ME nativos, con características específicas de humedad de la tierra con coloración oscura, hojarascas y trozos de corteza de árbol blanquecina,

conglomerado de raíces de diferente grosor, con insectos de tierra asociados a la degradación del suelo, este mantillo se mezcló con los siguientes componentes para la reproducción de los organismos nativos recolectados: 4 litros de suero de leche, 4 litros de melaza, 50 g de levadura y 12 kg de harina integral de *Triticum aestivum*. Seguidamente, se homogenizó la mezcla y se colocó en una bolsa plástica de color oscuro, se selló dicho contenedor con ligas plásticas evitando dejar restos de aire a la mezcla para luego ser introducido en un tanque de plástico hermético con intención de cultivar los microorganismos eficientes en una primera fase, bajo condiciones anaerobias por 21 días consecutivos. Cumplido el tiempo establecido, se procedió a extraer la cepa madre finalmente procesada del contenedor herméticamente cerrado (se tomó aproximadamente 15 kg del sólido) colocándolo en un recipiente de 70 litros de capacidad. Seguidamente, se añadieron al sólido una mezcla de suero de leche; melaza y agua sin cloro, en las siguientes proporciones: 4 litros de melaza, 4 litros de suero de leche, 5 g de levadura y se completó hasta 50 litros con agua sin cloro y, posteriormente, ser procesada durante 7 días adicionales en condiciones anaeróbicas, para finalmente obtener la solución inoculante líquida y concentrada de microorganismos eficientes anaerobios.

Posteriormente, se cultivaron ME en condiciones aeróbicas con la cantidad restante (aproximadamente 15 kg) de la cepa madre de ME cultivado a los 21 días. Para ello, se le añadió al material cantidades proporcionales de restos de desechos vegetales, cenizas, estiércol de caballo y tierra fértil rica en materia orgánica, con aireación (volteo sistemático semanal) hasta completar 60 días de tratamiento, dando como resultado un compost convencional con ME.

Diseño del proceso de tratamiento en las muestras de suelo

Teniendo homogenizada la muestra de suelo, procedente del complejo agroecológico “Los Cautaros”, se procedió a

ensamblar los tratamientos en réplicas de 5 muestras, para un total de sesenta y cinco tratamientos, correspondientes a las diferentes concentraciones preestablecidas, al tipo de microorganismo de acuerdo con su cultivo (aerobio o anaerobio) y procedentes de las dos localidades mencionadas. La aplicación de los ME en compost se hizo al inicio del tratamiento, mientras que el inóculo líquido (ME anaerobio) se realizó tres veces por semana por un periodo de 20 días de tratamiento continuo. Las muestras 1-5, corresponden al suelo sin tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño de los tratamientos en muestras de suelo con microorganismos eficientes.

Nº Muestras	%ME	Procedencia	Tipo de Cultivo
1-5	0	Base Agrícola	-
6-10	10	Rio Brito	Anaerobio
11-15	20	Rio Brito	Anaerobio
16-20	30	Rio Brito	Anaerobio
21-25	10	La Montañita	Anaerobio
26-30	20	La Montañita	Anaerobio
31-35	30	La Montañita	Anaerobio
36-40	10	Rio Brito	Aerobio
41-45	20	Rio Brito	Aerobio
46-50	30	Rio Brito	Aerobio
51-55	10	La Montañita	Aerobio
56-60	20	La Montañita	Aerobio
61-65	30	La Montañita	Aerobio

Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de Solanumlycopersicum muestra de suelo con los diferentes tratamientos con ME

Se tomaron muestras de suelo y se colocaron en recipientes plásticos de 15cm de diámetro, luego se procedió a realizar la siembra de 20 semillas en cada recipiente (5 réplicas) hasta completar la siembra de 100 semillas certificadas y para ello se pudo determinar el porcentaje de germinación (%G), mediante la expresión (1).

$$\%G = \frac{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas en la bandeja}}{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas en el testigo}} * 100 \quad (1)$$

El crecimiento se verificó cada dos días (al inicio del tratamiento) y posteriormente se realizó semanalmente. La longitud en la medición se realizó con un micrómetro Vernier marca Starrett en la primera semana y con una regla graduada de 50 cm hasta un periodo de gestación de 45 días. También se procedió a distinguir el tratamiento con mejor desempeño la estructura física (frondoso, tallo fuerte y hojas verdes) de las plántulas.

Análisis de suelos por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) analítica

La muestra de suelo seca se fijó en un porta-muestras para MEB con una cinta de doble cara de carbono. Luego fue cubierta con Au usando un equipo de sombreado metálico marca Baltzer, por 2 minutos, para aumentar la conductividad del sistema y así mejorar las imágenes proporcionadas por el equipo. Luego, se procedió a efectuar el análisis de las partículas de la muestra de suelo en un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca JEOL modelo JSM-T300 a una escala de aumento entre 100x y 10000x. Luego, se determinó la composición elemental semi-cuantitativa usando el mismo MEB equipado con un detector de Energía Dispersiva de Rayos X (EDX), operado con un voltaje de aceleración de 20KeV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del proceso de germinación de semillas certificadas de *S. lycopersicum* fueron satisfactorios en función de la rápida formación de las primeras plántulas, en particular en los tratamientos aerobios con respecto a los anaerobios, destacándose los tratamientos con ME en el suelo: 10% de ME de la localidad Río Brito, así como los tratamientos de suelo con ME al 10, 20 y 30%, procedentes de la localidad La Montañita, siendo las muestras del tratamiento aeróbico al 20% de ME con mayor número de semillas germinadas y en menor tiempo de germinación.

Una vez germinadas la totalidad de las semillas, se procedió medir la longitud de cada plántula desarrollada, pertenecientes a los distintos tratamientos con ME en el suelo. Se destacaron los correspondientes a los tratamientos aeróbicos con ME, y el de mayor crecimiento fue el de 20% ME La Montañita, en comparación con los tratamientos anaeróbicos y el control.

De esta manera se pudo seleccionar el suelo con tratamiento aem 20% procedente de la localidad La Montañita, con un 73% de rendimiento de germinación de semillas de *S. lycopersicum*. Además, este mismo tratamiento obtuvo también un destacado desempeño en crecimiento en la plántula cosechada, alcanzando una longitud máxima de 43,6 cm de longitud con una importante consistencia en tallo, hojas y raíces en comparación con los tratamientos anaeróbicos.

Para efecto de esta investigación la textura fue determinada en la muestra de suelo donde se observó el mejor rendimiento biológico (aem 20%) y en la muestra de suelo control.

En la figura 1 se observan los porcentajes en el tamaño de las partículas que conforman a cada muestra de suelo. Tanto en la muestra del suelo aem 20% como en la muestra del suelo control se observan similares tendencias en la proporcionalidad de sus principales componentes (arena, limo y arcilla) y prevaleciendo, en ambos casos, el siguiente orden descendiente textural: fracción arenosa > fracción arcillosa > fracción limosa. En la textura de las muestras evaluadas de suelo prevalece una alta proporción de arena y arcilla, presentando la fracción arcillosa del suelo un porcentaje mayor del 30%, lo cual favorece a que el suelo tenga capacidad de retención de agua y de nutrientes [21]. De acuerdo con la caracterización textural del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) [22], la granulometría del suelo estudiado es de tipo mediano, por lo cuales apropiado para ser empleado para la agricultura, clasificándose como un suelo arcillo-arenoso.

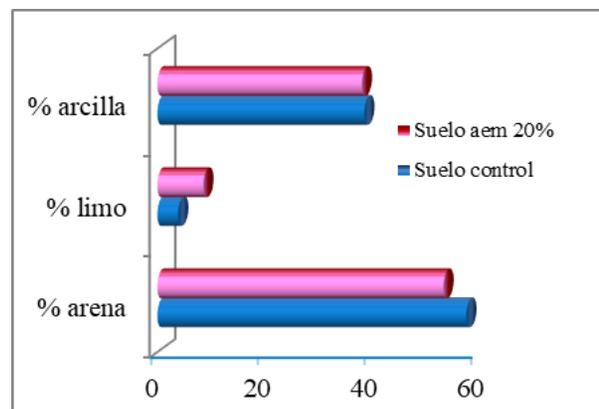


Fig. 1. Tamaño de las partículas del suelo control y suelo aem 20%.

Al comparar los valores de los porcentajes en las fracciones de la textura en las dos muestras de suelo, resalta que la fracción arenosa de suelo control presenta un porcentaje (57,57%) mayor que el de la muestra aem 20% (53,32%); lo contrario ocurrió con la fracción limosa, el porcentaje (8,57%) del suelo aem 20% fue mayor que el de la muestra control (3,87%). En relación con la fracción arcillosa hubo una muy pequeña variación entre el porcentaje, un 38,11% en el suelo aem 20% y el de la muestra control (38,56%). Estos resultados pueden inferir la incidencia de los ME en el aumento de la fracción limosa y con disminución de la fracción arenosa, lo cual convalida lo expresado por Wilpieszski [23] que para entender completamente los procesos biogeoquímicos que funcionan en los suelos, es necesario comprender las interacciones a escala micrométrica que ocurren entre las partículas del suelo y sus componentes microbianos.

En la figura 2 se muestra el espectro de EDX de cada elemento químico detectado en la muestra de suelo control y la tabla de la composición porcentual en masa y atómica para cada elemento químico, se observa que los mayores porcentajes son de los elementos químicos C y O, con una menor proporción de Fe, Al y Si, este último en una mayor proporción que los dos primeros, resaltando su porcentaje en masa y porcentaje atómico.

En cuanto al suelo aem 20%, se muestra en la figura 3 diferencias en la proporción de los elementos químicos C

y O con respecto al suelo control, específicamente hubo un incremento de más del 25% en el contenido de C y un descenso de más de 16% del contenido de O. Este efecto posiblemente estuvo influenciado por los procesos microbianos, cuya actividad probablemente requiere mayor consumo de oxígeno para su reproducción en el medio y para el crecimiento de su biomasa, implicando un aumento de C, en particular el C orgánico. Ese aumento fue evidenciado en esta investigación, lo que evidentemente modifica sustancialmente la composición en la química superficial del suelo.

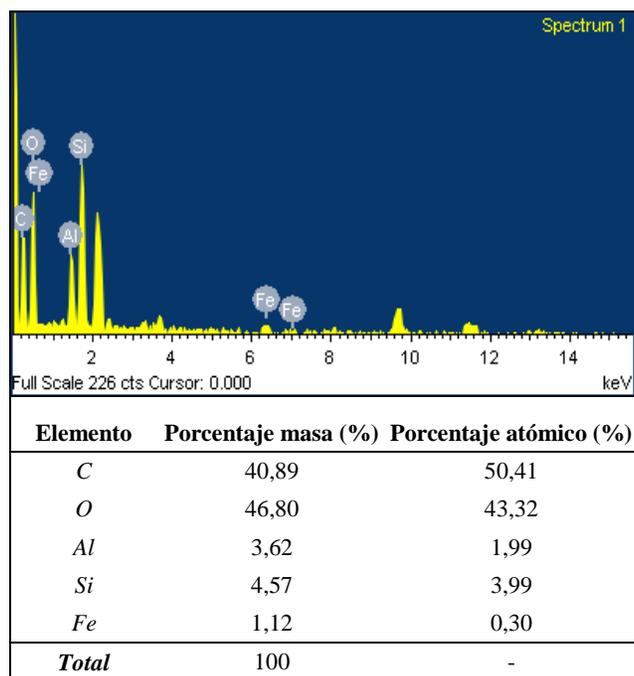


Fig. 2. Espectro EDX y composición porcentual de elementos químicos en suelo control de procedencia agrícola.

En la figura 3, también, se observan las composiciones porcentuales de los elementos químicos detectados por EDX en el suelo aem20%, en las cuales resaltan dos señales correspondientes a la composición porcentual de K y Ca, no detectadas en el suelo control, factiblemente también influenciado por los ME al 20% en compost.

En cuanto al incremento del potasio y calcio, por efecto de los ME cultivados en medio aeróbico, esto fue comprobado por medidas en un espectrómetro de emisión

óptica con plasma inductivamente acoplado, y se ha planteado que existen numerosos hongos y bacterias capaces de solubilizar minerales que contienen potasio por medio de la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos y la producción de polisacáridos [24,25].

Estos resultados del incremento del potasio disponible en el suelo, establecen la importancia de la aplicación de microorganismos eficientes, en este caso los aeróbicos en compost, para solubilizar K, mejorando así la productividad agrícola y una buena vía para reducir el uso de fertilizantes químicos, lo cual ha sido un foco de investigación reciente [26].

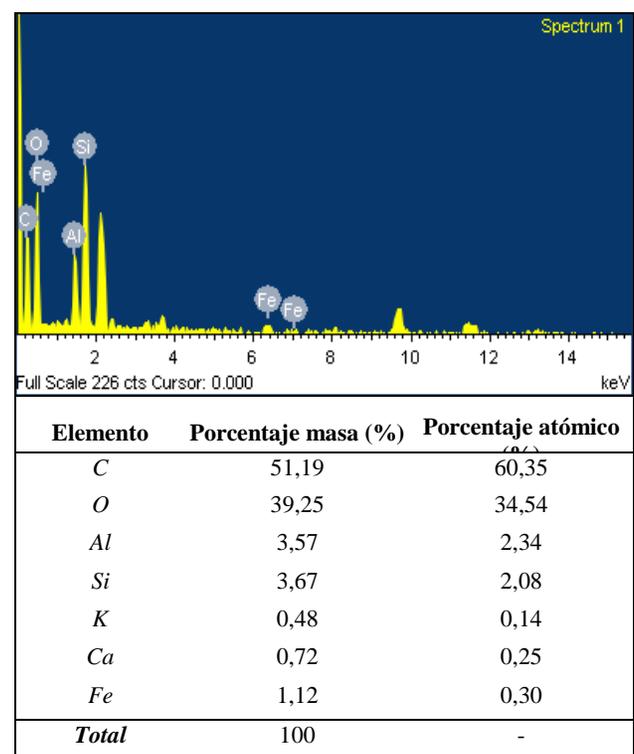


Fig. 3. Espectro EDX en muestra del suelo aem 20%.

En las micrografías mostradas en la figura 4, las muestras de suelo aem 20% y del suelo control mostraron una heterogeneidad morfológica de sus partículas. El control presentó mayor heterogeneidad de partículas que el suelo aem20% (figuras 4-A y 4-B).

Por otra parte, tomando en cuenta las partículas más pequeñas del suelo (limo-arcilla), la muestra control

presentó un tamaño aproximado de $20 \leq P \leq 1 \mu\text{m}$ y la muestra de suelo aem20% $35 \leq P \leq 1 \mu\text{m}$ (figuras 4-C y 4-D); lo cual indica que esta última presenta mayor rango de tamaños de partículas que la muestra control.

Los resultados en las micrografías presentadas en la figura 4 tienen correspondencia con el análisis de textura presentado en la figura 1, corroborándose que el suelo aem20% posee mayor proporción de arcilla-limo (47%) que la muestra control (41%).

Estos resultados muestran, en correspondencia con otras investigaciones [4,6,7], que las partículas de arcilla y limo son más importantes para los taxones microbianos que las de arena. Aunque otros investigadores plantean la falta de un vínculo demostrable entre la diversidad microbiana y las partículas de arena [27], los resultados en nuestra investigación muestran que las comunidades microbianas moderan la heterogeneidad del suelo, alterando no sólo el entorno químico sino también la estructura física, por lo que la heterogeneidad del suelo impulsa y es impulsada por la diversidad microbiana.

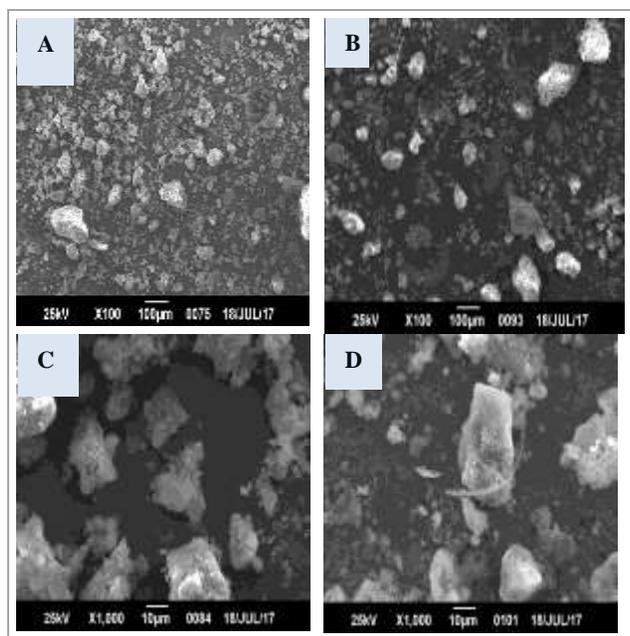


Fig. 4. Micrografías electrónicas realizadas a 100X y 1000X en muestra de suelo control y muestra de suelo aem20%. A y C: suelo control. B y D: suelo aem20%.

CONCLUSIÓN

La técnica MEB con EDX permitió confirmar la variación en la composición mineral de una muestra del suelo y también los cambios en la textura del suelo por efecto de los microorganismos eficientes, respecto al suelo control, particularmente los ME aeróbicos en compost.

AGRADECIMIENTOS

Los autores extienden sus agradecimientos al Prof. César Franco Ribero, responsable del Programa Nacional “Todas las Manos a la Siembra” en el estado Sucre, Venezuela, por el apoyo en preparación de los Microorganismos Eficientes en forma aeróbica y anaeróbica; al Prof. José Véliz, de la Universidad del Oriente, Venezuela, por su aporte en el diseño de los tratamientos para la evaluación del proceso de germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *S. lycopersicum*; finalmente, al Lic. Gleen Rodriguez y la Universidad Simón Bolívar, por el apoyo con el microscopio electrónico de barrido.

REFERENCIAS

- [1] Vogel H-J., Eberhardt E., Franko U., Lang B., Ließ M., Weller U., Wiesmeier M., Wollschläger U. (2019) “Quantitative evaluation of soil functions: potential and state” *Front. Environ. Sci.* 7:164.
- [2] van der Heijden M.G., Bardgett R.D., van Straalen N.M. (2008) “The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems” *Ecol. Lett.* 11:296-310.
- [3] Ling L.L., Schneider T., Peoples A.J., Spoering A.L., Engels I., Conlon B.P., Mueller A., et al. (2015) “A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance” *Nature* 517:455-459.
- [4] Seaton F., George P., Lebron I., Jones D. L., Creer S., Robinson D. A. (2020) “Soil textural heterogeneity impacts bacterial but not fungal diversity” *Soil Biol. Biochem.* 144:107766.

- [5] Scott J., Naiman R. (2006) "Soil texture and nitrogen mineralization potential across a riparian toposequence in a semi-arid savanna" *Soil Biol. Biochem.* 38(6):1325-1333.
- [6] Hamarashid N., Othman M.A., Hussain M.H. (2010) "Effects of soil texture on chemical compositions, microbial populations and carbon mineralization in soil" *Egypt. J. Exp. Biol.* 6(1):59-64.
- [7] Naveed M., Herath L., Moldrup P., Arthur E., Nicolaisen M., Norgaard T., et al. (2016) "Spatial variability of microbial richness and diversity and relationships with soil carbon, texture, and structure across an agricultural field" *Appl. Soil Ecol.* 103:44-55.
- [8] Wang G., Or D. (2012) "A hydration-based biophysical index for the onset of soil microbial coexistence" *Sci. Rep.* 2:881. DOI: 10.1038/srep00881.
- [9] Vos M., Wolf A.B., Jennings S.J., Kowalchuk G.A. (2013) "Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil" *FEMS Microbiol. Rev.* 37:936-954.
- [10] Tecon R., Or D. (2017) "Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil" *FEMS Microbiol. Rev.* 41:599-623.
- [11] Cluzeau D., Guernion M., Chaussod R., Martin-Laurent F., Villenave C., Cortet J., et al. (2012). "Integration of biodiversity in soil quality monitoring: baselines for microbial and soil fauna parameters for different land-use types" *Eur. J. Soil Biol.*, 49:63-72.
- [12] Richardson A., Barea J., Mc Neill A., Prigent C. (2009) "Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms" *Plant. Soil* 321:305-339.
- [13] Higa T. (2012) "*Kyusei Nature arming and environmental management through effective microorganisms - The past, present and future*" Department of Horticulture, University of the Ryukyus Okinawa, Japan., 5 p.
- [14] Pereira F., Gomes I., Lima I., Pereira A., Boaneres de Souza D. (2020) "*Caderno dos microrganismos eficientes (EM): instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM*" 3ª Edição Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitotecnia, 32p.
- [15] Hoyos A. (2010) "Microorganismos eficientes y su beneficio para la agricultura y el medio ambiente" *Jou. Cie. Ing.* 2:42-45.
- [16] Javaid A. (2010) "*Beneficial microorganisms for sustainable agriculture*" In: Lichtfouse, E. (Ed.), Genetic Engineering, Biofertilisation, Soil Quality and Organic Farming, Sustainable Agriculture Reviews, Vol 4, Chapter 12. Cham, Springer International Publishing, pp. 347-369.
- [17] Morocho T., Leiva-Mora M. (2019) "Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas" *Ctro. Agr.*, 46(2):93-103.
- [18] Villacís L., Zapata J., León O., Vásquez C., Mullo J., Zapata A., Gutierrez A. (2016) "Compatibilidad y sobrevivencia de microorganismos benéficos de uso agrícola (*Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis* y *Paecilomyces lilacinus*) en compost" *J. Selva Andina Biosph.*, 4(2):93-99.
- [19] Avila G. M., Gabardo G., Clock D. C., Lima-Junior O. S. (2021) "Use of efficient microorganisms in agriculture" *Res. Soc. Dev.*, 10(8): e40610817515-13.
- [20] Beretta A., Silbermann A., Paladino L., Torres D., Bassahun D., Musselli R., García, A. (2014) "Soil texture analyses using a hydrometer: modification of the Bouyoucos method" *Cien. Inv. Agr.*, 41(2):263-271.
- [21] Emamgolizadeh S., Bateni S., Shahsavani D., Ashrafi T., Ghorbani H. (2015) "Estimation of soil cation exchange capacity using Genetic Expression Programming (GEP) and Multivariate Adaptive Regression Splines (MARS)" *J. Hydrol.* 529:1590-1600.

- [22] USDA NRCS. (2009) "Guía para la evaluación de la calidad y salud del suelo" Departamento de Agricultura, Servicio de Investigación Agrícola, Servicio de Conservación de Recursos Naturales, Instituto de Calidad de Suelos, USA.
- [23] Wilpiseski R., Aufrecht J., Retierer S., Sullivan M., Graham D., Pierce E., Zablocki O., Palumbo A., Elias D. (2019) "Soil aggregate microbial communities: Towards understanding microbiome interactions at biologically relevant scales" *Appl. Environ. Microbiol.* 85(14):e00324-19.
- [24] Chand Kasana R., Raten Panwar N., Burman U., Bhushan Pandey C., Kumar P. (2017) "Isolation and identification of two potassium solubilizing fungi from arid soil" *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6(3): 1752-1762.
- [25] Etesami H., Emami S., Ali Alikhani H. (2017) "Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - a review". *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 17(4):897-911.
- [26] Dong X., Lv L., Wang W., Liu Y., Yin C., Xu Q., Yan H., Fu J., Liu X. (2019) "Differences in distribution of potassium-solubilizing bacteria in forest and plantation soils in Myanmar". *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16:700.
- [27] Carson J.K., Campbell L., Rooney D., Clipson N., Gleeson D.B. (2009) "Minerals in soil select distinct bacterial communities in their microhabitats" *FEMS Microbiol. Ecol.* 67(3):381-388.