

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION DE INGENIERIA
CIENCIAS DEL SUELO**



Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de
fosforo de suelos áridos en el noreste Mexicano.

Por:

Abraham Isabel Becerra Berlanga

Tesis

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:
Ingeniero**

AGRICOLA Y AMBIENTAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Mayo 2018

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION DE INGENIERIA

Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de
fosforo de suelos áridos en el noreste Mexicano

POR:

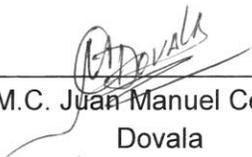
ABRAHAM ISABEL BECERRA BERLANGA

TESIS

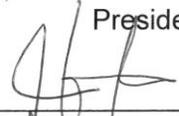
**Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como
requisito para obtener el título de:**

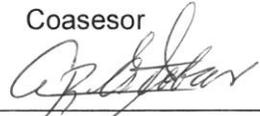
INGENIERO AGRICOLA Y AMBIENTAL

Aprobado por el comité de Asesoría:


M.C. Juan Manuel Cepeda
Dovala
Presidente


Dr. Antonio Serguei Ledezma
Pérez
Coasesor

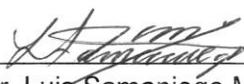

Dr. Marco Antonio Castillo
Campohermoso
Coasesor


M.C. Alejandra R. Sánchez
Escobar
Suplente

Universidad Autónoma Agraria
"Antonio Narro"



Coordinación de la División
de Ingeniería


Dr. Luis Samaniego Moreno
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México. Mayo 2018

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

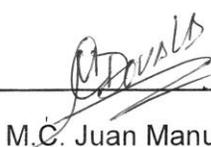
DIVISION DE INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DEL SUELO

El que suscribe, Profesor-Investigador del Departamento de Ciencias del Suelo. Hago constar que el trabajo de tesis titulado **Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo de suelos áridos en el noreste Mexicano.**

Depende del proyecto **Caracterización genómica y proteómica en la biosíntesis de hule en plantas de guayule (*Parthenium argentatum gray*)** con Clave 247278 dentro de la convocatoria **CONACYT-Solución a problemas nacionales 2014.**

El Dr. Marco Antonio Castillo Campohermoso es el responsable como Asesor de Tesis del C. Abraham Isabel Becerra Berlanga con Matricula 41135310 de la Especialidad de Ingeniero Agrícola y Ambiental.



M.C. Juan Manuel Cepeda Dovala

Profesor-Investigador

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por haberme dado la oportunidad y por ponerme de los medios necesarios para poder presentar este trabajo, que si bien sin su ayuda y voluntad no estaría aquí.

Agradezco a mis asesores por apoyarme en esta pequeña travesía y tenerme mucha paciencia en la realización y revisión de este trabajo, gracias por sus consejos y por ser a la vez como unos segundos padres en este maravilloso tiempo.

Agradezco a mis padres Oscar Becerra Parra y Reyna Berlanga Duarte, que a pesar de los malos tiempos que vivimos en el pasado, nunca han dejado de demostrarme cuanto me aman y que siempre han estado aconsejándome en decisiones muy importantes en mi vida y ¿Por qué no? Hasta me han dado mi dosis de “estate quieto” cuando cometo algunas faltas pero que gracias a eso y mucho más me encuentro en esta posición en mi vida.

Agradezco a mis hermanos José de Jesús Becerra Berlanga y Oscar Paul Becerra Berlanga, que a pesar de nuestra marcada diferencia de edades, nuestras peleas constantes y nuestros gustos variados, siempre están en los momentos más difíciles de mi vida, dándome ánimos a su manera para que salga adelante, cuidándome a mis espaldas y aceptando mis caprichos, que si bien nunca les digo cuanto los aprecio, quiero que sepan que no hay palabras que puedan expresarlo y que lo único que puedo hacer por ahora para demostrarlo es inmortalizarlo en este texto donde quiero que conozcan que estoy feliz de ser su hermano.

Agradezco a mis sobrinos, que siendo honestos son como mis hijos, ya que me han hecho madurar de una forma que pocos tienen de hacerlo, ustedes me han hecho encontrar el valor de seguir adelante, me han ayudado entender que si bien en varios trabajos que tenga no veré resultados al momento pero estaré seguro que trabajare por un lugar mejor donde ustedes puedan aprovechar esos resultados, me han hecho entender y experimentar el verdadero significado del amor de un padre hacia sus hijos; en verdad aunque parezca algo estricto ante ustedes, quiero que sepan que ustedes son la razón por la cual yo puedo ser feliz y salir a enfrentar al mundo sin miedo.

Agradezco a mis tías Ana María Becerra Parra por siempre estar presente en mi formación como persona desde niño y adoptarme en su corazón como un hijo más y darme los cuidados que una madre daría, además de consentirme en mis

antojos y caprichos en la comida; Lidia María Berlanga Duarte y Juana María Berlanga Duarte por estar siempre al pendiente mío, dándome consejos y apoyándome en mis decisiones, siempre cuidando de mi cuando no me doy cuenta.

Agradezco a mi prima Mónica Cecilia Becerra Parra, por ser mi cómplice, mi amiga, mi familia, eres la hermana que nunca tuve y con la que he vivido muchas experiencias y todavía las que faltan por vivir, que a pesar de ser un poco menor que yo, a veces demuestras tener más sabiduría que alguien más grande pero siempre tienes tu manera de hacer las cosas, gracias por estar ahí para mí en todo momento.

Y agradezco a todas esas personas que no he mencionado pero que siempre han estado ahí para apoyarme en mis momentos más difíciles, siempre aconsejándome o haciéndome caer para luego levantarme, con las que he vivido experiencias únicas y que me han ayudado a ser lo que soy ahorita. No tengo más que decirles que gracias por todo su apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	III
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEORICO	3
OBJETIVOS	11
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	11
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
HIPOTESIS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
1.1. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA Y MUESTREO EDÁFICOS DEL SUELO.....	12
1.2. PUESTA A PUNTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE LOS M.O.O.S. A PARTIR DE LA RIZOSFERA DEL GUAYULE.	13
1.3. INOCULACIÓN DE MUESTRAS <i>IN VITRO</i>	14
1.4. CRECIMIENTO DE BACTERIAS.....	16
1.5. ESPORAS/ML DE HONGOS.....	18
1.6. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SOLUBILIZACIÓN Y EFICIENCIA RELATIVA DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFORO POR BACTERIAS.....	20
1.7. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SOLUBILIZACIÓN Y EFICIENCIA RELATIVA DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFORO POR HONGOS.	21
1.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	22
1.8.1. <i>Bacterias</i>	22
1.8.1. <i>Hongos</i>	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
1.1. AISLAMIENTOS DE MICROORGANISMOS.....	24
1.2. BACTERIAS AISLADAS.	25
1.2.1. <i>Índice de solubilización de fósforo en bacterias (I.S.)</i>	25
1.2.2. <i>Eficiencia relativa de solubilización en bacterias (ERS)</i>	29
1.2.3. <i>Análisis estadístico del I.S. de las bacterias aisladas</i>	32
1.2.4. <i>Análisis estadístico de la ERS de las bacterias aisladas</i>	33
1.3. HONGOS AISLADOS.....	35
1.3.1. <i>Índice de solubilización de fosfatos en hongos (I.S.)</i>	35
1.3.2. <i>Eficiencia relativa de solubilización de fosfatos en hongos (ERS)</i>	38
1.3.3. <i>Análisis de varianza para I.S. en hongos</i>	41
1.3.4. <i>Análisis de varianza para ERS en hongos</i>	42
CONCLUSIONES	44

RESUMEN	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	52
1. ETIQUETAS DE MUESTRAS DESPUÉS DE SER CONSERVADAS.....	52
2. DILUCIONES POR BACTERIAS CADA 24 HR.....	53
3. MUESTRAS DE HONGOS CADA 24 HR.	63

ÍNDICE DE CUADROS

FIGURA 1. UBICACIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO. _____	12
FIGURA 2. POTENCIÓMETRO. _____	13
FIGURA 3. AUTOCLAVE SEMIAUTOMÁTICA. _____	14
FIGURA 4. CAMPANA DE FLUJO LAMINAR. _____	14
FIGURA 5. INCUBADORA 1. _____	15
FIGURA 6. INCUBADORA 2. _____	16
FIGURA 7. DIVISIÓN DE CAJAS. _____	17
FIGURA 8. EQUIPO BIO-PAD GEL DOC EZIMAGER _____	18
FIGURA 9. CÁMARA DE NEUBAUER. _____	19
FIGURA 10. BACTERIA 6 CON 24 HR DE INCUBACIÓN: A) DILUCIÓN 10^0 ; B) DILUCIÓN 10^3 ; C) DILUCIÓN 10^6 ; D) DILUCIÓN 10^{10} . _____	34
FIGURA 11. BACTERIA 6 CON 48 HR DE INCUBACIÓN: A) DILUCIÓN 10^0 ; B) DILUCIÓN 10^3 ; C) DILUCIÓN 10^6 ; D) DILUCIÓN 10^{10} . _____	34
FIGURA 12. BCTERIA 6 CON 72 HR DE INCUBACIÓN: A) DILUCIÓN 10^0 ; B) DILUCIÓN 10^3 ; DILUCIÓN 10^6 ; D) DILUCIÓN 10^{10} . _____	35
FIGURA 13. MUESTRAS <i>IN VITRO</i> DEL HONGO 10 CON 10 000 ESPORAS/ML.A) HONGO CON 24 HR DE INCUBACIÓN; B) 48 HR DE INCUBACIÓN; C) 72 HR DE INCUBACIÓN; D) 120 HR DE INCUBACIÓN. _____	43

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. ÍNDICE DE SOLUBILIZACIÓN DE LAS BACTERIAS (1, 2, 3, 4, 5, 6 Y 7) CON LAS DILUCIONES (1, 3, 6, 10) DONDE A) REPRESENTA 24 HRS DE INCUBACIÓN; B) 48 HRS DE INCUBACIÓN Y; C) 72 HRS DE INCUBACIÓN.....	27
GRÁFICA 2. EFICIENCIA RELATIVA DE SOLUBILIZACIÓN DE LAS BACTERIAS (1, 2, 3, 4, 5, 6 Y 7) CON LAS DILUCIONES (1, 3, 6, 10) DONDE A) REPRESENTA 24 HR DE INCUBACIÓN; B) 48 HR DE INCUBACIÓN Y; C) 72 HR DE INCUBACIÓN.	30
GRÁFICA 3. ÍNDICE DE SOLUBILIZACIÓN DE HONGOS (2, 6, 9 Y 10) Y CONCENTRACIONES (10 000, 50 000 Y 100 000) DONDE A) 48 HRS DE INCUBACIÓN; B) 72 HRS DE INCUBACIÓN Y; C) 120 HRS DE INCUBACIÓN.	37
GRÁFICA 4. EFICIENCIA RELATIVA DE SOLUBILIZACIÓN EN HONGOS (2, 6, 9 Y 10) Y CONCENTRACIONES (10 000, 50 000 Y 100 000) DONDE A) 48 HR DE INCUBACIÓN; B) 72 HR DE INCUBACIÓN Y; C) 120 HR DE INCUBACIÓN.	40

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. FORMAS DE FÓSFORO INORGÁNICO PRESENTES EN LOS SUELOS.....	7
TABLA 2. GÉNEROS DE BACTERIAS Y HONGOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATOS.....	8
TABLA 3. PRINCIPALES ÁCIDOS ORGÁNICOS PRODUCIDOS POR MICROORGANISMOS.....	9
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL SUELO MUESTREADO.....	14
TABLA 5. ETIQUETAS DE AISLAMIENTOS DE MUESTRAS.....	15
TABLA 6. CONCENTRACIÓN DE ESPORAS/ML Y CONCENTRACIÓN A UTILIZAR.....	20
TABLA 7. DATOS DE MEDIAS DE ÍNDICE DE SOLUBILIZACIÓN EN BACTERIAS.....	28
TABLA 8. DATOS DE MEDIAS DE EFICIENCIA RELATIVA DE SOLUBILIZACIÓN.....	31
TABLA 9. DATOS DE MEDIA DE ÍNDICES DE SOLUBILIZACIÓN.....	38
TABLA 10. DATOS DE MEDIA DE EFICIENCIA RELATIVA DE SOLUBILIZACIÓN.....	41

INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un elemento esencial para el desarrollo de las plantas. Este elemento, se encuentra en la totalidad de los suelos en formas iónicas muy poco solubles para el aprovechamiento de las plantas. La forma en la que se puede encontrar el P varía dependiendo del pH del suelo, por ejemplo, en suelos ácidos forma enlaces con el Aluminio (Al) y el Hierro (Fe) dando lugar a compuestos como Varicita ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y livianita [$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$], y; en suelos alcalinos forma enlaces con el Calcio (Ca) formando compuestos como fosfato tricálcico [$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]. Por otra parte, para que en el suelo se mantenga el fósforo de manera disponible se requiere que se encuentre en forma de iones monobásicos ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) y dibásicos (HPO_4^{-2}), una condición de pH de 6.5 en el suelo, permitiendo de este modo que la planta asimile este elemento de carácter eficiente.

Existen varias formas de compensar la falta de fósforo en el suelo; una de ellas y la más frecuentemente utilizada, consiste en el uso de fertilizantes químicos, sin embargo, esta opción resulta en su mayoría en el escurrimiento del fertilizante provocando la erosión del suelo, donde se deposita en cuerpos de agua causando la eutrofización, además que es un recurso no renovable y de acuerdo a las reservas el medio estaría agotándose para el año 2035. Más recientemente, y con el fin de aprovechar de una manera más eficiente el fosforo que se encuentra en el suelo se ha recurrido al uso de mecanismos que permiten la solubilización de las diferentes formas en que se encuentra este elemento, mediante la inoculación de microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF), siendo ésta una opción más amigable con el medio ambiente, ya que son microorganismos extraídos del suelo y su función es transformar el fósforo de formas no disponibles a formas disponibles para que las plantas lo puedan aprovechar; además de ser una opción más económica.

En este trabajo de tesis, se llevó a cabo un estudio experimental en suelos con clima semiárido de los estados de Durango y San Luis Potosí que nos permitiera establecer la presencia y capacidad de microorganismos solubilizadores de fosforo. En este estudio se trabajó con microorganismos (hongos y bacterias) extraídos de suelos con climas semiáridos, a partir de los cuales se propagaron y se aislaron los diferentes tipos de microorganismos (hongos y bacterias) presentes en las diferentes muestras de suelo aplicando el cultivo en placas de Petri con medio NBRIP adicionando con fosfato tricálcico. Para cada uno de los microorganismos aislados se aplicaron metodologías que nos permitieran conocer la capacidad de solubilización de fosforo mediante la evaluación de parámetros tales como índice de solubilización y su eficiencia de solubilización. Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) en colaboración con la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

MARCO TEORICO

Si bien en la actualidad la sociedad ha estado adquiriendo consciencia del cuidado del medio ambiente, la mayoría de los esfuerzos se han enfocado en el cuidado del agua y el aire, ya que son los recursos que más se tienen presente en el uso diario, ya sea para actividades recreativas, deportivas, de uso doméstico, etc. y con los grandes trabajos realizados por grandes empresas en la conservación del agua o la pureza del aire. Dentro de este contexto, existe un recurso que debería considerarse a la misma altura de estos en cuestión de importancia, este recurso es el Suelo.

De acuerdo a un documento emitido en el 2010 por la *Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la Agricultura* [FAO], el Suelo se define como “La capa externa, poco compacta, de la superficie terrestre, donde se llevan a cabo la generalidad de los procesos agrícolas, por ser la región donde se sustenta la vida en la tierra”. Un suelo está constituido por diferentes componentes dentro de los cuales se puede identificar: a) materia mineral, ya sean por los elementos que lo conforman (sílice, aluminio, etc.) o por el tamaño de sus partículas (arena, limo y arcilla); b) Agua; c) Aire; d) materia orgánica- humus; e) Organismos vivos; siendo la diferente proporción de estos componentes lo que da origen a las distintas características y tipos de suelo dependiendo de cada ubicación o región geográfica (Di Barbaro, et al., 2009).

Tomando en consideración los componentes del suelo, cabe destacar que la presencia de “organismos vivos” es de importancia fundamental debido a la función que realizan dentro de los procesos y ciclos biogeoquímicos. El término de “organismos vivos” se refiere a todos los organismos que habitan y ayudan a los diferentes ciclos geoquímicos que se realizan en el suelo. Todos los organismos vivos cumplen con un papel importante en la formación de un suelo, y esto ha quedado demostrado a través del análisis de las diferentes poblaciones de organismos que lo constituyen, ya que en un gramo de suelo obtenido de un jardín

se estima que existen entre 10 y 20 millones de bacterias, medio millón de hongos, 50 000 algas y 30 000 protozoarios y cada uno de estos cumple una función en específico liberando elementos, transformando otros y descomponiendo o creando compuestos (Gross, et al., 1995).

Es importante considerar que la cantidad y tipo de microorganismos presentes en un suelo va a ser dependiente del tipo y la región geográfica del mismo, por ejemplo, si nosotros muestreamos y analizamos un gramo de suelo del amazonas en Brasil y un gramo de suelo en el desierto de Egipto, difícilmente podríamos esperar que se encontraría la misma cantidad de microorganismos en ambos suelos o generalizar el resultado de alguna muestra para los demás suelos, ya que las poblaciones de microorganismos tendrán una variación la cual estará limitada por algunos factores como : a) la densidad de raíces; b) la cantidad de materia orgánica disponible proveniente de la descomposición de las raíces y restos de plantas y; c) la profundidad a la que se analice el suelo, etc. De tal manera, los microorganismos tienen un papel muy importante para la agricultura mediante las diferentes funciones que realizan, ya que ayudan a la absorción de diferentes elementos indispensables para la nutrición vegetal como el carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, etc. (Biavati & Fernandez, 2012). Estos microorganismos reciben el nombre de microorganismos promotores de crecimiento vegetal o PGPM por sus siglas en inglés (plant growth promoting microorganism).

La forma en que los PGPM actúan sobre el desarrollo vegetal es a través de diferentes mecanismos dentro de los cuales se pueden destacar la solubilización de fosfato inorgánico, disminución de los niveles de etileno en plantas, fijación de nitrógeno atmosférico, bio-control de enfermedades en plantas, entre otras formas más (Datta, et al., 2011). Los PGPM solubilizadores de fósforo no solo incluyen bacterias, si no también hongos y actinomicetos que tienen la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico el cual se encuentra fijado en el suelo, es por esto que su rol ecológico es esencial.

De manera general, las plantas toman sus nutrientes ya sea del suelo de forma iónica y de la atmosfera; en el caso específico del fósforo, este elemento se toma del suelo en forma inorgánica en estado soluble y constituye más del 0.2% del peso seco de la planta (Banerjee, et al., 2010). El fósforo tiene una alta capacidad para reaccionar con diferentes elementos, es por esto que nunca se encuentra solo. En las rocas fosfóricas (RF) se encuentra enlazado con el oxígeno formando fosfatos, el cual se desgasta, desintegra y disgrega lentamente por acción de la lluvia, el viento, el deshielo, etc. provocando la liberación de los fosfatos; estos son acarreados al fondo del mar, ríos o arroyos y se depositan como sedimentos; con las corrientes que emergen desde el fondo de las aguas, llevan parte del fósforo el cual es aprovechado por el fitoplancton; y otra parte, permanece en el fondo marino convirtiéndose en nuevas rocas sedimentarias. El fosfato es absorbido por las plantas y lo usan para sus procesos vitales, donde al morir tanto plantas como animales, son descompuestos por bacterias que disgregan la materia orgánica y reintegran el fósforo al suelo de manera soluble, donde pueden transformarse en fósforo inorgánico, llegar al fondo marino o ser absorbido por las plantas. Este es uno de los ciclos más lentos por los procesos que se deben llevar a cabo fig. 1 (Anon., 2016).

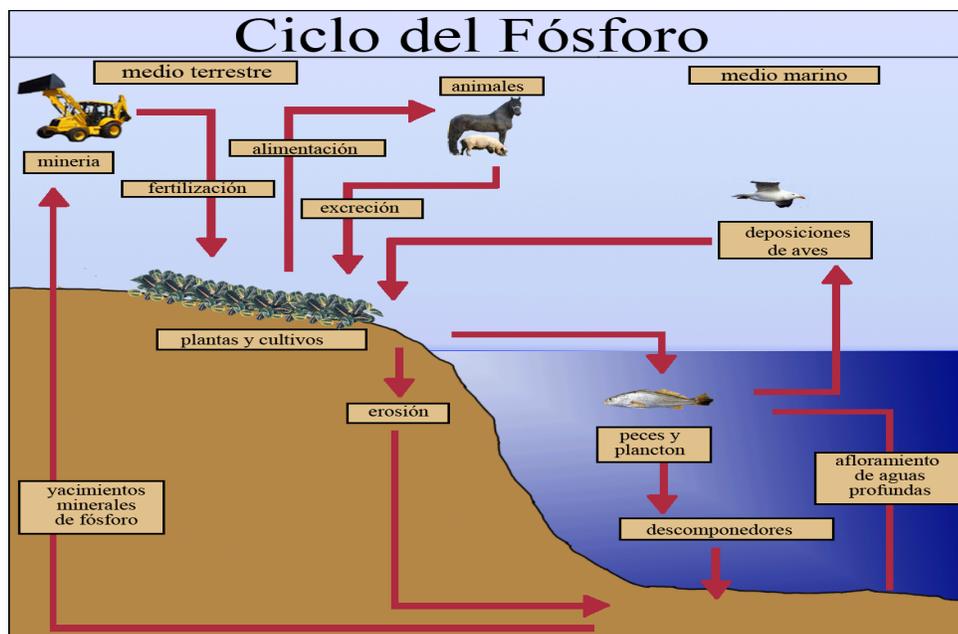


Figura 1. Ciclo del fósforo.

La forma en que se puede encontrar este elemento en el suelo es como orto fosfatos en iones monobásicos ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) y dibásicos (HPO_4^{-2}) (Khan, et al., 2007). Sin embargo, para que el fósforo se encuentre de manera soluble y se disminuya la precipitación con el aluminio y el calcio, se requiere un pH de 6.5 (Sylvia, et al., 1995). En los suelos al norte del territorio mexicano el principal problema es la precipitación de fósforo con el calcio, formando fosfato tricálcico (Ca_3PO_4) haciéndolo débilmente soluble para las plantas y creando un pH de 8.0 o mayor (SMART Fertilizer Management, 2017).

La disponibilidad del fósforo es cada vez más limitada debido a la insuficiencia de sus fuentes naturales, su relativa escasez edáfica, elevada retención por parte de la matriz del suelo, la falta de reposición natural y su baja movilidad comparada con la de otros nutrientes (Rubio, 2012). En general en el suelo se presentan coeficientes de difusión del fosfato de $0.3\text{-}3.3 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ y su concentración en el suelo es de 0.02 ppm. Esto ha provocado que para compensar los requerimientos de este elemento, se apliquen grandes cantidades de fertilizantes fosforados para suplir la alta demanda de este nutriente; un ejemplo simple de esto se presenta en el cultivo del ajo, el cual requiere de $50 \text{ a } 65 \times 10^6 \text{ ppm de P/Ha}$ (Bertoni & Morard du L, 1988), sin embargo, esto incrementa la pérdida potencial por escorrentía superficial, lo cual acelera los procesos de eutrofización en cuerpos de agua (Achal et al, 2007; Banerjee et al, 2010).

Las rocas fosfóricas (RF) constituyen la única fuente de suministro de fosfatos. A este respecto, en la naturaleza se presentan dos tipos de RF, siendo estas las ígneas y las sedimentarias, donde estas últimas son las de mayor explotación de hasta un 80% (McClellan & Kauwenbergh, 2004); Fixen, 2009). Se estima que el recurso se acabaría en este siglo, siendo en el año 2035 cuando la demanda de fósforo supere a la oferta, es por esto que y por ser un recurso no renovable se debe tener el mejor manejo posible (Fernandez, 2014).

El fósforo en el suelo se encuentra en diferentes formas y puede ser categorizado como fósforo inorgánico y orgánico. La distribución de estas formas depende del tipo de suelo, pH, tipo de vegetación, actividad microbiana y entradas de fertilizantes (Rooney & Clipson, 2009). Los compuestos de fósforo inorgánico pueden encontrarse de distintas formas tal como se puede visualizar en la Tabla 1. Es posible encontrarlo como sales en solución, sales cristalinas o sales absorbidas por los coloides del suelo, en suelos con pH alcalino, también pueden formar enlaces de gran estabilidad con hidróxido de hierro, aluminio o manganeso (Bobadilla & Rincon, 2008).

Tabla 1. Formas de fósforo inorgánico presentes en los suelos.

Tipo de fosfato	Denominación	Composición	Características
Fosfatos de calcio	Hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}(\text{OH})_2$	Muy abundante
	Oxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaO}$	Menos abundante
	Fluoroapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaFe}_2$	Muy abundante
	Carbonatoapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaCO}_3$	Menos abundante
	Fosfato tricalcico	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Menor solubilidad
	Fosfato dicálcico	CaHPO_4	Mayor solubilidad
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$	Mayor solubilidad
Fosfatos de hierro	Livianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles
	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles
Fosfatos de aluminio	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles

Fuente: Bobadilla et al, 2008.

Por otra parte el fósforo orgánico se encuentra presente en el suelo, debido a la degradación microbiana de la materia orgánica y puede llegar a representar hasta un 50% de fósforo total insoluble dependiendo del tipo de suelo (Gyaneshwar et al, 2002; Oliviera et al, 2008).

1.1. Microorganismos solubilizadores de fósforo

Dentro del grupo de microorganismos promotores del crecimiento en plantas (PGPM), los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF) constituyen una población importante, ya que están involucrados en un amplio rango de procesos que afectan la solubilización del fósforo (Fankem, et al., 2006). Los MSF se encuentran en todos los suelos y su número varía, siendo en la rizosfera donde se encuentra una concentración más alta (Paul & Sundara, 1971; Rodríguez & Fraga, 1999).

De acuerdo a un estudio desarrollado por Behera, et al (2013), las bacterias presentes en el suelo, son los microorganismos predominantes en cuanto a la capacidad para solubilizar fósforo, representando del 1 al 50 % del potencial de solubilización de fósforo, mientras que para el caso de los hongos y actinomicetos estos constituyen del 0.1 al 0.5 % de este potencial. En la Tabla 2 se muestran los principales géneros de bacterias y hongos con capacidad de solubilización de fosfatos.

Tabla 2. Géneros de bacterias y hongos solubilizadores de fosfatos.

Género de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF)			Género de hongos solubilizadores de fosfato (HSF)
Achromobacter	Erwinia	RanHELLA	Aspergillus
Acinobacter	Flavobacterium	Ralstonia	Fusarium
Aereobacter	Gordonia	Rhodobacter	Mucor
Agrobacterium	Kitasatospora	Rhodococcus	Paecilomyces
Arthrobacter	Klebsiella	Serratia	Penicillium
Bacillus	Mesorhizobium	Sinorhizobium	Rhizopus
Bradyrhizobium	Micrococcus	Streptomyces	Sclerotium
Burkholderia	Mycobacterium	Streptosporangium	Sytdidium
Chrysobacterium	Pantoea	Thiobacillus	Talaromyces
Delftia	Phyllobacterium	Yarrowia	Trichocladium
Enterobacter	Pseudomonas		

Fuente: (Holguin Sterling, 2015)

Una de las características que permite establecer la posibilidad de que algunos microorganismos realizan una función o actividad sobre cierto tipo de elementos es que el medio en el que se encuentran tiende a ser de pH bajo, esto se debe a que los microorganismos producen distintos ácidos que ayudan a que los elementos sean asimilables para las plantas (Gross, et al., 1995). Estos ácidos son conocidos como ácidos orgánicos, tal es el caso del ácido Glucónico, Cítrico, Láctico, Málico, entre otros, los cuales además han encontrado otros usos diferentes en la actualidad como saborizantes de alimentos, en la industria, polímeros, síntesis de químicos, etc. (Malgorzata, et al., 2016). En la Tabla 3, se muestran los distintos ácidos orgánicos producidos por los microorganismos.

Tabla 3. Principales ácidos orgánicos producidos por microorganismos.

Glucónico	Cítrico	Láctico
Acético	2-cetoglucónico	Butírico
Succínico	Glicónico	Oxálico
Malónico	Málico	Fumárico
Adípico	Indolacético	Fórmico

Fuente: (Paredes & Espinosa, 2010; Pérez, et al., 2012)

La actividad solubilizadora de los microorganismos depende de la limitación de fósforo en el medio ya que a poca cantidad de fósforo se libera una enzima conocida como glucosa deshidrogenasa (GDH), la cual se cree que conduce el proceso de solubilización en bacterias *Gram negativas* y su actividad aumenta cinco veces con la limitación de fósforo (Muleta, et al., 2013).

En las zonas semiáridas de México, existen una gran variedad de plantas de gran importancia económica industrial y con un gran potencial de aprovechamiento, sin embargo estas especies tienen algunos factores limitantes que impiden su manejo, dentro de los cuales se puede mencionar la disponibilidad de nutrientes. Es importante mencionar que en estas zonas semiáridas, al ser áreas constituidas por

suelos con un pH alcalino, de poca vegetación y con climas extremos, el fósforo es un limitante para la producción de muchas de estas plantas, entre dichas plantas importantes se encuentra el guayule (*Parthenium argentatum*).

El guayule (*Parthenium argentatum*), es una planta de gran importancia económica ya que es muy reconocida por producir un tipo de látex hipoalergénico, el cual ha sido utilizado como fuente de energía, como adhesivo para maderas así como en la industria para la fabricación de llantas, cinturones, tuberías de hule, ropa deportiva, entre muchas aplicaciones más (Rodríguez, et al., 2011) (CONABIO, 2009). Siendo una planta que crece en pendientes suaves del 5 al 15 % con una precipitación de hasta 300 mm anuales y produce del 5 al 17% de hule (Jasso de Rodríguez, et al., 1993). El estudio sistemático de la microflora presente en la rizosfera así como el análisis de la capacidad solubilizadora de los microorganismos presentes, representa un área de oportunidad que nos permita desarrollar a futuro sistemas de manejo de estos cultivos a través de la bioinoculación de MSF y su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de la planta de guayule.

Por todo lo anterior en la presente tesis, se realizó un estudio sistemático sobre suelos de la rizosfera del guayule de los estados de Durango y San Luis Potosí, con la finalidad de estudiar la microflora presente así como la capacidad solubilizadora de fósforo de las bacterias y hongos presentes en el suelo. Es importante mencionar que hasta el momento no se tienen registros de estudios similares a éste, por lo que esta investigación resulta relevante.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo general.

- Realizar un estudio sistemático que permita el aislamiento de microorganismos (bacterias y hongos) de la rizosfera de *Parthenium argentatum* y evaluar su capacidad para la solubilización de fósforo.

1.2. Objetivos específicos.

- Colectar, aislar, reproducir y purificar los MSF provenientes del suelo de la rizosfera del guayule.
- Evaluar los parámetros de índice de solubilización (I.S.) y eficiencia relativa de solubilización (ERS) de los MSF aislados y purificados.

HIPOTESIS

- $H_0 = p > F$, no existen microorganismos con capacidad solubilizadora de fósforo en la rizosfera del guayule.
- $H_a = p < F$, existen microorganismos con capacidad solubilizadora de fósforo en la rizosfera del guayule.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Localización geográfica y muestreo edáficos del suelo.

Se localizaron 2 sitios de muestreo en el estado de Durango en la zona de Mapimí con coordenadas $25^{\circ}49'7.97''\text{N}$, $103^{\circ}50'54.44''\text{O}$ y, otros 2 sitios en el estado de San Luis Potosí, en el municipio de Vanegas con coordenadas $23^{\circ}49'23.75''\text{N}$, $100^{\circ}55'21.71''\text{O}$ tal como se puede apreciar en los mapas de la Figura 1. De la rizosfera del guayule se recolectaron muestras de suelo a una profundidad de 10 cm, fueron depositados en botes de plástico con capacidad de (1 Lt) y fueron trasladadas al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) donde fueron cribadas por un tamiz de 2mm de diámetro para homogenizar todas las muestras. En la tabla 4 se muestran las características físicas del suelo.

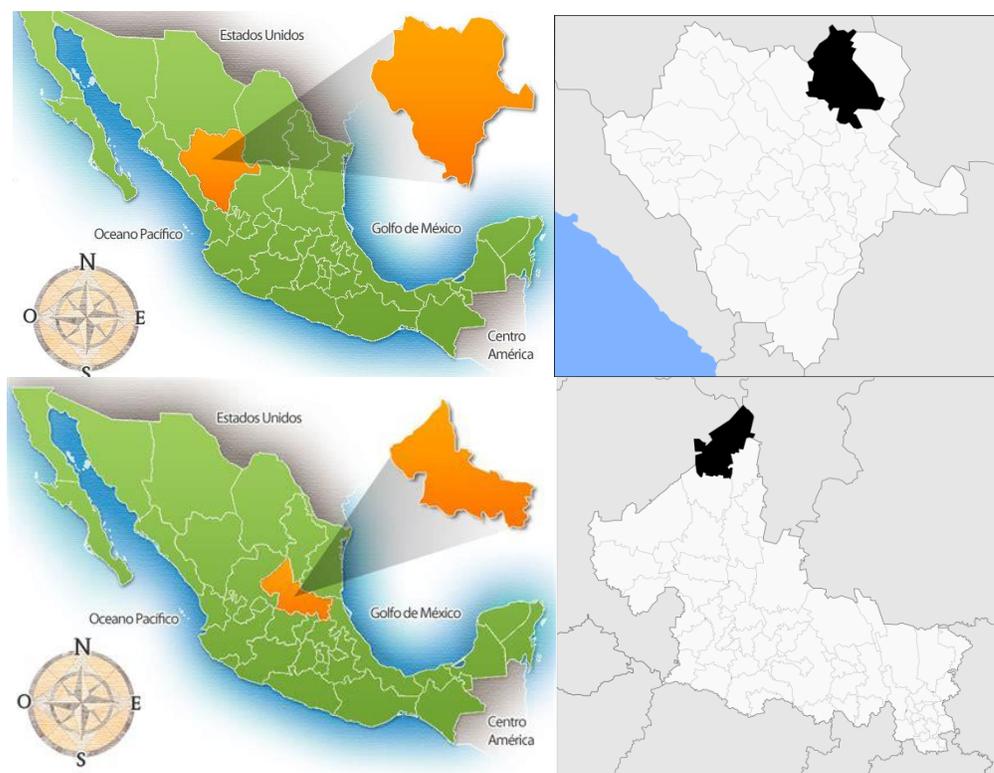


Figura 1. Ubicación de puntos de muestreo.

1.2. Puesta a punto de los medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos a partir de la rizosfera del guayule.

Debido a la poca o nula información al respecto del aislamiento de MSF en ambientes desérticos, este trabajo se inició con la exploración de medios de cultivo con la finalidad de obtener el mejor medio para el aislamiento de los MSF de las muestras a partir de la rizosfera del guayule. Después de una búsqueda en la bibliografía de estudios similares, se tomó la decisión de iniciar con medio NBRIP adicionado con fosfato tricálcico ($3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (Restrepo, et al., 2015); se le agregó azul de bromofenol como un colorante indicador; Se ajustó el pH del medio a 7.0 con ayuda de un potenciómetro Orion Star AIII Thermo Scientific (Figura 2) y fue esterilizado en un autoclave semiautomática modelo MCA Novatech (Figura 3) a $121^\circ\text{C} \times 20$ min. Al término del proceso de esterilización se vació el medio en cajas Petri de plástico dentro de una cabina de flujo laminar de la marca CHCbiolus (Figura 4) previamente esterilizada con alcohol etílico al 70% y rayos UV por 5 min, donde se dejaron reposar las cajas hasta que el medio se solidificó.



Figura 2. Potenciómetro Orion Star AIII Thermo Scientific.



Figura 3. Autoclave semiautomática MCA novatech.



Figura 4. Cabina de flujo laminar CHCbiolus.

Tabla 4. Características físicas del suelo muestreado.

Lugar de muestra	Coordenadas	Textura	pH	Tipo de suelo
Mapimí, Durango.	25°49'7.97"N 103°50'54.44"O	Franco Arenoso	8.6	Calcisol
Vanegas, SLP.	23°49'23.75"N 100°55'21.71"O	Franco Arenoso	8.4	Calcisol

1.3. Inoculación de muestras *in vitro*.

Como ensayo preliminar se realizaron 6 diluciones (10^1 hasta 10^6) con las muestras de suelos, donde fueron sembrados bajo el método por estrías, haciendo 2 repeticiones por dilución; paralelamente se hizo otra prueba donde, se vació 1 gr de

suelo de cada muestra, la cual se dispersó por toda la caja como si de un salero se tratara; se etiquetaron las muestras (Tabla 5) y se metieron en una incubadora marca Thelco precision (Figura 5) por 4 días con una temperatura de 28°C. Al término de este periodo se procedió al aislamiento de aquellos microorganismos que formaban un halo transparente, el cual indicaba su efecto solubilizador sobre el fósforo.



Figura 5. Incubadora marca Thelco precision.

Para el aislamiento o purificación de estos microorganismos se hicieron bajo el método por estrías en cajas Petri. Para ello, las placas se mantuvieron en la incubadora por un periodo de 5 días a 28°C. Este periodo se definió para comprobar que fueron completamente aisladas y no se contaminaran de otros microorganismos.

Tabla 5. Etiquetas de aislamientos de muestras.

Lugar de procedencia	Etiqueta
Durango	Dgo S-3
	Dgo S-4
San Luis Potosí	SLP S-5
	SLP S-6

Una vez aislados los microorganismos se conservaron dos muestras de cada uno siguiendo el método modificado con glicerol al 80% (Arencibia, et al., 2008) y otras dos muestras fueron liofilizadas y selladas aplicando vacío. Ya conservados, se les asignó una nueva etiqueta de identificación con las cuales se trabajarían siendo en caso de hongos etiquetados con la sigla H y el numero en forma ascendente empezando por el 1, en el caso de bacterias con la sigla B y de igual forma empezando por el 1 de manera ascendente. En el anexo 1 se observa cómo quedaron finalmente etiquetadas las muestras.

1.4. Crecimiento de bacterias

Las bacterias purificadas previamente y almacenadas a una temperatura de -80°C , se propagaron en medio LB liquido por 24 hrs a una temperatura de 28°C ; al cumplir el plazo, con ayuda de una micro pipeta, se agregó 1 ml de muestra en un matraz de 250 ml con 10 ml de LB liquido previamente esterilizado, se pasaron las muestras a una incubadora shaker New Brunswick Scientific (Figura 6).



Figura 6. Incubadora Shaker New Brunswick Scientific.

Al término de 6 hrs se hicieron diluciones de 1:10 logrando hacer de 10^1 , 10^2 , 10^3 hasta 10^{10} , de las cuales se trabajó con 4 diluciones que fueron la 10^0 , 10^3 , 10^6 y 10^{10} y cada una con su respectiva repetición obteniendo un total de 8 muestras por bacteria; así mismo, las placas de NBRIP con las que se trabajó se dividieron en 3 partes (Figura 8). Las cuales se les midió los halos cada 24 hrs hasta 72 hrs con ayuda del programa Image Lab y un equipo especial llamado Bio-pad Gel Doc EZ Imager (Figura 9) (en el cual se midió el área que ocupa la bacteria y el área que ocupaba el halo de solubilización, en caso de presentarlo).



Figura 7. División de cajas.



Figura 8. Equipo Bio-rad Gel Doc EZ Imager

1.5. Esporas/ml de hongos.

En el caso de los hongos, se eligieron 4 hongos (H2, H6, H9 y H10) los cuales presentaban halos de solubilización. Se resembraron en placas con medio Agar Dextrosa y Papa (PDA) y se dejaron incubar por 8 días a 28°C hasta que los hongos esporularan para posteriormente hacer un proceso de filtrado, humedeciendo el medio con solución fisiológica al 0.85% y raspando la superficie con una espátula, vaciando el sobrenadante en un matraz de 250 ml y sometido a agitación por 30 min; al terminar el periodo se pasó la muestra por un embudo de vidrio con algodón estéril, depositándose en un matraz de 250 ml previamente esterilizado.

Para determinar el número de esporas/ml se realizó con una cámara de Neubauer (Figura 9), agregando con una micro pipeta 20µl por las orillas de la cámara y se hizo un conteo de las esporas que entraban en los cuadrantes 1 y 4.



Figura 9. Cámara de Neubauer.

En caso de que la cantidad de esporas fuera muy grande, se realizaron diluciones 1:10, hasta tener una cantidad de esporas contables por cuadrante y con ayuda de la siguiente formula se determinó cuantas esporas/ml había y cuantos ml se requerían para trabajar por muestra que tuvieran 10 000 esporas/ml, 50 000 esporas/ml y en unos casos (como el H2 y H9) de 100 000 esporas/ml (tabla 6). En el caso de los hongos 6 y 10, no se trabajó con concentraciones mayores a 50 000 esporas/ml, debido a que a estas concentraciones su manejo era imposible para su inoculación.

Fórmula para determinar las esporas/ml:

$$\text{Concentración: } \frac{N^{\circ} \text{ esporas} * 10,000 * \text{dilucion}}{N^{\circ} \text{ de cuadros contados}}$$

Tabla 6. Concentración de esporas/ml y concentración a utilizar.

Hongo	[] total esporas/ml	[] deseada	ml a usar
2	437 500	10 000	0.007
		50 000	0.035
		100 000	0.070
6	953 125	10 000	0.010
		50 000	0.052
9	2'343 750	10 000	0.004
		50 000	0.021
		100 000	0.043
10	750 000	10 000	0.013
		50 000	0.066

Una vez obtenidas las concentraciones, se depositaron con una micro pipeta dentro de cajas petri con medio NBRIP divididas en 3 espacios iguales, las cuales se pusieron a incubar a 28°C, donde cada 24 hrs hasta 120 hrs se medía el volumen de la colonia del hongo y del volumen del halo en caso de presentarlo esto con ayuda del mismo equipo.

1.6. Determinación del índice de solubilización y eficiencia relativa de solubilización de fosforo por Bacterias.

Para el establecimiento del índice de solubilización se utilizó la formula $A+B/A$ (A: diámetro de la colonia; B: diámetro del halo) (Kumar & Narula, 1999; Lara, et al., 2011) para determinar el Índice de solubilización (IS), a las 24, 48 y 72 hr, siendo este un parámetro cualitativo para evaluar la capacidad de solubilización de las bacterias.

Mientras que para la eficiencia relativa de solubilización (ERS) se utilizó la formula $(A/B)*100$ (donde A= diámetro de halo; B= diámetro de bacteria) (Ponmurugan & Gopi, 2006).

1.7. Determinación del índice de solubilización y eficiencia relativa de solubilización de fosforo por Hongos.

Para el índice de solubilización en hongos, se utilizó la misma fórmula empleada para las bacterias la cual es $A+B/A$ (A: diámetro de la colonia; B: diámetro del halo) (Kumar & Narula, 1999; Lara, et al., 2011), a las 24, 48, 72 y 120 hr.

Para la determinación de eficiencia relativa de solubilización (ERS) se calculo con la formula $(A/B)*100$ donde A= diámetro del halo y B= diámetro del hongo (Vera, et al., 2002; Hernandez-Leal, et al., 2011).

1.8. Análisis estadístico.

1.8.1. Bacterias

Para el análisis estadístico de bacterias, el diseño utilizado, para todas las variables, fue factorial de 7x4 en bloques. Donde el factor A es la bacteria (*BACTERIA*) con 7 niveles (B1, B2, B3, B4, B5, B6 y B7) y el factor B es cada una de las diluciones (*DILUCIONES*) con 4 niveles, donde $10^0= 1$; $10^3= 3$, $10^6= 6$ y $10^{10}=10$. Lo que genera 28 tratamientos o interacciones.

1. B1-1	15. B4-6
2. B1-3	16. B4-10
3. B1-6	17. B5-1
4. B1-10	18. B5-3
5. B2-1	19. B5-6
6. B2-3	20. B5-10
7. B2-6	21. B6-1
8. B2-10	22. B6-3
9. B3-1	23. B6-6
10. B3-3	24. B6-10
11. B3-6	25. B7-1
12. B3-10	26. B7-3
13. B4-1	27. B7-6
14. B4-3	28. B-10

Así mismo, se utilizó el método estadístico LSD de Fisher con un 95% de índice de confianza para las variables I.S. y ERS.

1.8.1. Hongos

En el caso de los hongos para el análisis estadístico, el diseño utilizado, para todas las variables, fue factorial de 4x3 en bloques. Donde el factor A es el hongo (*Hongo*) con 4 niveles (H2, H6, H9 y H10) y el factor B es cada una de las

concentraciones (*Concentración*) con 3 niveles (10 000 esporas/ml, 50 000 esporas/ml). Lo que genera 12 tratamientos o interacciones.

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| 1. H2-10 000 esporas/ml | 7. H9-10 000 esporas/ml |
| 2. H2-50 000 esporas/ml | 8. H9-50 000 esporas/ml |
| 3. H2-100 000 esporas/ml | 9. H9-100 000 esporas/ml |
| 4. H6-10 000 esporas/ml | 10. H10-10 000 esporas/ml |
| 5. H6-50 000 esporas/ml | 11. H10-50 000 esporas/ml |
| 6. H6-100 000 esporas/ml | 12. H10-100 000 esporas/ml |

Donde de igual manera, se utilizó el método estadístico LSD de Fisher con un 95% de índice de confianza para las variables I.S. y ERS.

Se analizaron los datos de I.S. y ERS a las 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs en bacterias donde se utilizaron (de manera representativa los datos obtenidos a las 72 hrs). Para los hongos se analizaron los datos de 48 hrs, 72 hrs y 120 hrs en los hongos (mostrándose de manera representativa los datos de 120 hrs para I.S. y ERS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1. Aislamientos de microorganismos.

De las pruebas realizadas, de la primera etapa de aislamiento se observó que a partir de la dilución 10^3 , el crecimiento era muy poco o nulo, mientras que en la prueba donde se vació el suelo directo, se obtuvieron buenos resultados en relación al crecimiento de los microorganismos y por lo tanto se utilizó el segundo método de siembra para continuar con los estudios.

En total se lograron aislar 10 hongos y 5 bacterias del suelo muestreado de San Luis Potosí y 4 hongos y 2 bacterias del suelo muestreado en Durango. De esta cantidad en total solo 11 presentaron acción solubilizadora, mostrando esta característica 4 hongos y 7 bacterias aisladas.

La cantidad de MSF (hongos y bacterias) encontrados por un estudio realizado por Delgado, et al., (2014) en suelos de climas áridos fue de 11 a comparación de un estudio realizado por Pérez, et al (2007), en suelos con climas tropicales donde se llegaron a aislar hasta 130 MSF, donde fueron seleccionados por haber mostrado la formación de halo que está asociado a la hidrólisis del fosfato tricálcico (TCP) (Naik, et al., 2008; Ahmad, et al., 2008). Estos estudios se mencionan para recalcar que de manera general en suelos áridos la cantidad de MSF encontrados es menor comparada con la cantidad de MSF encontrados en suelos tropicales.

1.2. Bacterias aisladas.

1.2.1. Índice de solubilización de fósforo en bacterias (I.S.).

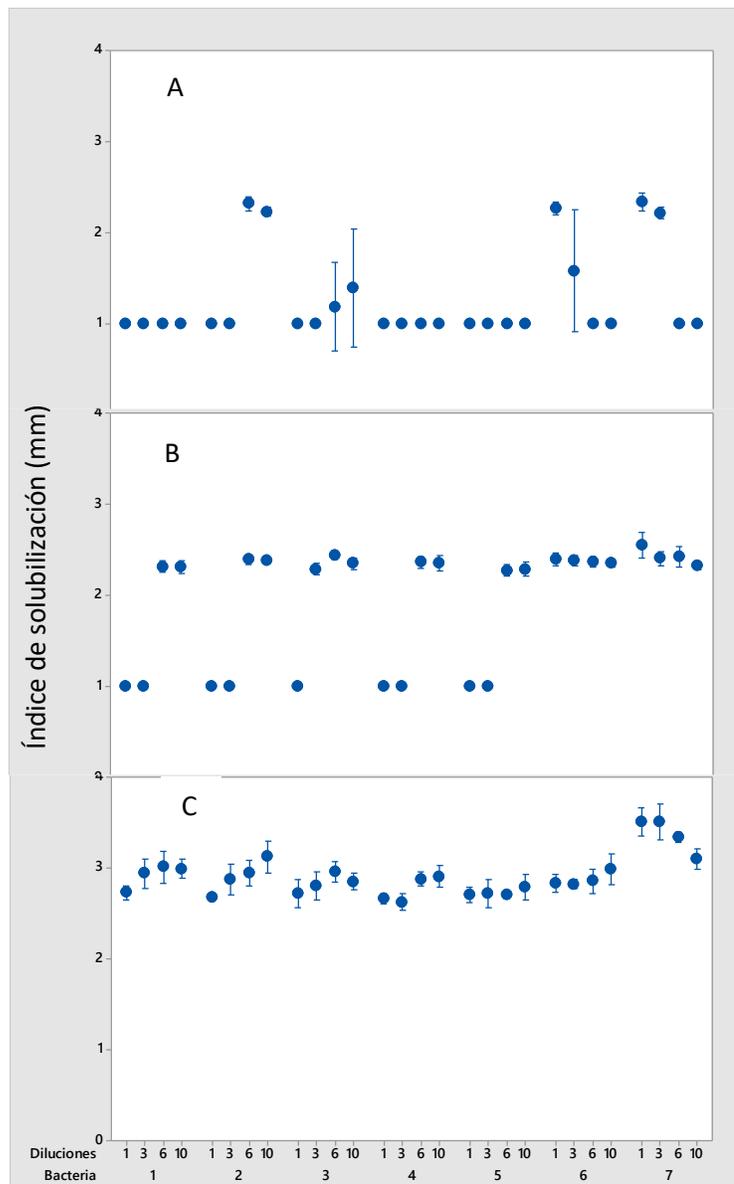
En la Grafica 1-A, y tabla 7, se puede observar, que para la dilución (10^0) las bacterias no presentaron índice de solubilización (I.S.), exceptuando las bacterias 6 y 7 con valores de 2.2 y 2.3 respectivamente; en la dilución (10^3), de igual manera las bacterias 6 y 7 fueron las únicas que tuvieron índice de solubilización (1.5 y 2.2 respectivamente); sin embargo, para las diluciones 10^6 y 10^{10} , las bacterias que únicamente presentaron I.S. fueron solamente las bacterias 2 y 3 con valores máximos de 2.3 y 1.4 respectivamente.

Con los resultados mencionados anteriormente posiblemente el tiempo transcurrido de incubación es determinante para usar el fósforo como fuente de producción de enzimas y crecimiento de bacterias (excepto para algunas bacterias, principalmente la bacteria 7). Ya que como se sabe el P es un macronutriente esencial para el crecimiento bacteriano y cuando existe la suficiente cantidad de fósforo para dicho crecimiento, las bacterias no realizan ninguna actividad solubilizadora de fósforo, sin embargo, cuando las bacterias requieren fósforo para el desarrollo de enzimas y crecimiento, estas pueden solubilizar el fósforo insoluble produciendo ácidos orgánicos principalmente (Chen, et al., 2016).

Al término de las 48 hrs de incubación (Grafica 1-B), todas las bacterias presentaron halos de hidrolisis en las diluciones mayores (10^6 y 10^{10}), sin embargo, la bacteria 7 fue la que presentó un mayor índice de solubilización de hasta 2.6 en la dilución 10^0 .

Transcurridas las 72 hrs, (Grafica 1-C) todas las bacterias (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7) en todas sus diluciones (10^0 , 10^3 , 10^6 , 10^{10}) presentaron halos de hidrolisis del fosfato tricálcico, aunque es de recalcar que nuevamente la bacteria 7 supera a las demás bacterias, llegando a tener un índice de solubilización de hasta a 3.5.

Con los resultados obtenidos en la gráfica 1-C, se podría asumir que las bacterias dependen para su crecimiento de diversos factores entre los que se pueden mencionar la temperatura, pH y densidad celular (población bacteriana) etc., ya que como se observa a las 72 hrs para todas las diluciones y todas las bacterias se presenta un índice de solubilización. Esto posiblemente se debe a la competencia que se desarrolla entre las bacterias al final de su crecimiento exponencial (Iañez, 1998), en este caso se presume sea a las 72 hrs. Por otra parte Iañez (1998) menciona que mientras la colonia va creciendo, esta va sintetizando y excretando al medio un péptido llamado factor activador de la competencia (FAC).



Gráfica 1. Índice de Solubilización de las bacterias (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) con las diluciones (1, 3, 6, 10) donde A) representa 24 hrs de incubación; B) 48 hrs de incubación y; C) 72 hrs de incubación.

Tabla 7. Datos de medias de índice de solubilización en bacterias.

Bacteria	Dilución	Media de índice de solubilización (mm)		
		24 hrs	48 hrs	72 hrs
7	0	2.34	2.56	3.51
	3	2.22	2.41	3.52
	6	1.00	2.43	3.35
	10	1.00	2.33	3.11
6	0	2.27	2.40	2.84
	3	1.58	2.38	2.83
	6	1.00	2.37	2.86
	10	1.00	2.35	2.99
5	0	1.00	1.00	2.71
	3	1.00	1.00	2.72
	6	1.00	2.28	2.71
	10	1.00	2.38	2.79
4	0	1.00	1.00	2.66
	3	1.00	1.00	2.63
	6	1.00	2.36	2.88
	10	1.00	2.36	2.91
3	0	1.00	1.00	2.72
	3	1.00	2.29	2.81
	6	1.19	2.45	2.96
	10	1.39	2.35	2.85
2	0	1.00	1.00	2.68
	3	1.00	1.00	2.88
	6	2.32	2.39	2.95
	10	2.23	2.38	3.13
1	0	1.00	1.00	2.73
	3	1.00	1.00	2.94
	6	1.00	2.32	3.02
	10	1.00	2.31	3.00

*Tabla con datos de medias de derivaciones estandar obtenidas del analisis estadistico por el metodo de Fisher de los índices de solubilización. En rojo se presentan los indices mas altos obtenidos para 24 hr, 48 hr y 72 hr.

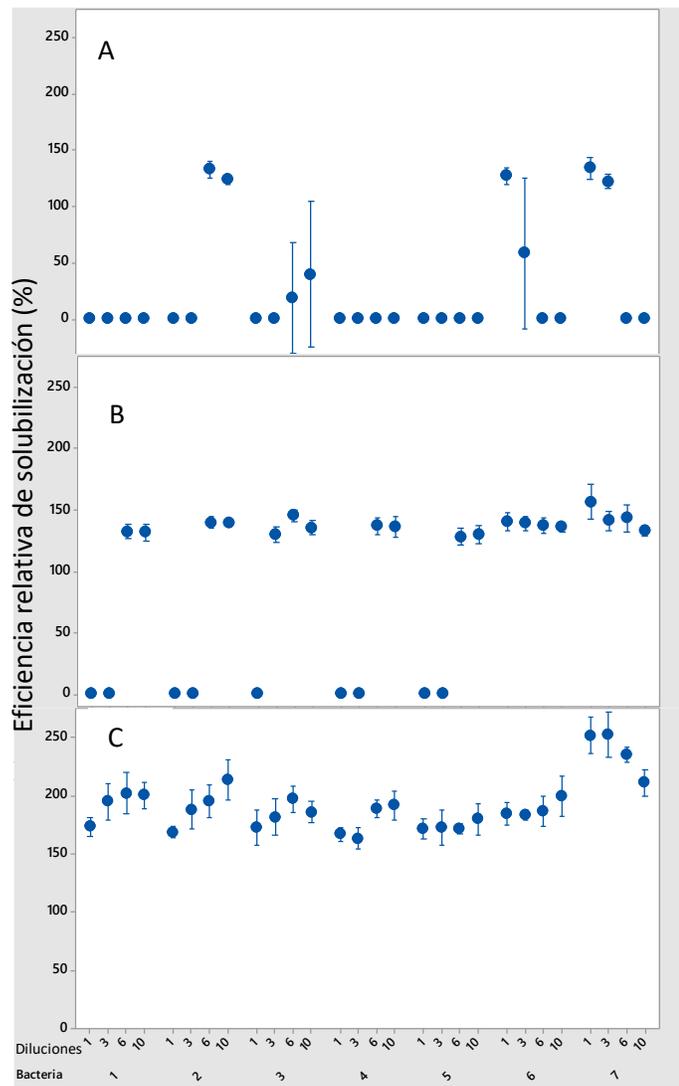
Por otra parte, es de resaltar que las bacterias 6 y 7 tienen un índice de solubilización destacable desde las 24 hrs de incubación, sin embargo, la bacteria 7 tuvo valores de hasta 3.5 a las 72 hrs de crecimiento (Grafica 1-C). Estos resultados concuerdan con lo reportado por (1, 2, 3), quienes reportan índices de solubilización

que van desde 2 en *Azootobacter sp.*, 3.6 de una bacteria de un cultivo de arroz y 4.1 en *Pseudomonas sp.*

1.2.2. Eficiencia relativa de solubilización en bacterias (ERS).

En la grafica 2, tabla 8, se puede observar que a partir de las 24 hrs de incubación la mayoría de las bacterias evaluadas no presentaron ninguna ERS sin embargo, la *bacteria 7* fue la que tuvo la mayor ERS con un valor de 134.17% (dilución 10^0) aunque a partir de las de 48 hrs todas las bacterias en algunas diluciones presentaron ERS, la *bacteria 7* se mantuvo con el mayor valor de 156.26% (dilución 10^0). Cabe destacar que la ERS a las 72 hr. se presentó en todas las bacterias y en todas las diluciones sin embargo, la *bacteria 7* se mantuvo con la mayor ERS alcanzando valores de hasta 252.07% (3 días de incubación). Estos resultados son mayores a los reportados por (Shekar, 2006), quien obtuvo un valor máximo de ERS de 121.6% en *Pseudomonas sp.*, durante 14 días de incubación. Por otra parte Ponmurugan & Gopi (2006) reportaron una ERS de 75% a 7 días de incubación. Finalmente Delgado et al (2014) obtuvieron 80% a los tres días de incubación.

Como se puede observar los resultados obtenidos en este ensayo experimental muestran una Eficiencia Relativa de Solubilización (ERS) mucho mayor a las obtenidas por otros investigadores, además recalcar que los microorganismos evaluados en este trabajo provienen de suelos áridos del desierto chihuahuense, de los cuales se tiene poca o nula investigación. Es importante mencionar que la ERS se puede ver afectada por diferentes factores como lo son los nutrientes, pH, humedad, materia orgánica y actividades relacionadas con las enzimas del suelo (Ponmurugan & Gopi, 2006).



Gráfica 2. Eficiencia Relativa de Solubilización de las bacterias (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) con las diluciones (1, 3, 6, 10) donde A) representa 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación y; C) 72 hr de incubación.

Tabla 8. Datos de medias de eficiencia relativa de solubilización.

Bacteria	Dilución	Eficiencia relativa de solubilización (%)		
		24 hrs	48 hrs	72 hrs
7	1	134.17	156.26	251.64
	3	122.25	141.22	252.07
	6	0.00	143.10	235.22
	10	0.00	133.28	211.19
6	0	127.34	149.63	184.27
	3	58.45	138.94	183.32
	6	0.00	137.29	186.28
	10	0.00	135.99	199.43
5	0	0.00	0.00	171.61
	3	0.00	0.00	172.58
	6	0.00	128.25	171.42
	10	0.00	129.40	179.84
4	0	0.00	0.00	166.62
	3	0.00	0.00	163.35
	6	0.00	136.82	188.97
	10	0.00	136.52	191.73
3	0	0.00	0.00	172.51
	3	0.00	129.61	181.61
	6	19.03	145.15	196.87
	10	39.79	135.61	185.89
2	0	0.00	0.00	168.72
	3	0.00	0.00	188.33
	6	132.80	139.71	195.64
	10	123.80	138.85	213.15
1	0	0.00	0.00	173.56
	3	0.00	0.00	194.73
	6	0.00	132.43	202.10
	10	0.00	131.57	200.13

*Tabla con datos de medias de derivaciones estandar obtenidas del analisis estadístico por el metodo de Fisher para las eficiencias de solubilización en bacterias. En rojo se presentan los indices mas altos obtenidos para 24 hr, 48 hr y 72 hr.

1.2.3. Análisis estadístico del I.S. de las bacterias aisladas.

Análisis de Varianza para índice de solubilización (I.S.)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	p>F
Bacteria(Diluciones)	24	8.2513	0.34381	23.87	0.000
Error	140	2.0161	0.01440		
Total	167	10.7423			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.120002	81.23%	77.61%	72.97%

El análisis estadístico demuestra que existen diferencias altamente significativas entre la bacteria 7 con respecto a las demás bacterias para la variable I.S. esto se puede corroborar con la prueba de Fisher que se muestra a continuación.

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Bacteria(Diluciones)	N	Media	Agrupación
7(3)	6	3.52075	A
7(1)	6	3.51648	A
7(6)	6	3.35221	B
2(10)	6	3.13154	C
7(10)	6	3.11191	C D
1(6)	6	3.02102	C D E
1(10)	6	3.00135	C D E F
6(10)	6	2.99439	D E F G
3(6)	6	2.96872	E F G H
2(6)	6	2.95642	E F G H I
1(3)	6	2.94734	E F G H I J
4(10)	6	2.91736	E F G H I J K
4(6)	6	2.88976	E F G H I J K
2(3)	6	2.88133	F G H I J K
6(6)	6	2.86285	G H I J K L
3(10)	6	2.85897	H I J K L
6(1)	6	2.84278	H I J K L M
6(3)	6	2.83327	I J K L M
3(3)	6	2.81618	J K L M N
5(10)	6	2.79845	K L M N
1(1)	6	2.73565	L M N O
5(3)	6	2.72580	M N O
3(1)	6	2.72511	M N O
5(1)	6	2.71615	M N O
5(6)	6	2.71426	M N O
2(1)	6	2.68726	N O
4(1)	6	2.66624	O
4(3)	6	2.63350	O

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

1.2.4. Análisis estadístico de la ERS de las bacterias aisladas.

Análisis de Varianza para Eficiencia Relativa de Solubilización (ERS)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	p>F
Bacteria(Diluciones)	24	82513	3438.1	23.87	0.000
Error	140	20161	144.0		
Total	167	107423			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
12.0002	81.23%	77.61%	72.97%

El análisis estadístico muestra nuevamente, tener diferencias altamente significativas entre la bacteria 7 con respecto a las demás bacterias para la variable ERS esto se puede corroborar con la prueba de Fisher que se muestra a continuación.

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Bacteria(Diluciones)	N	Media	Agrupación
7(3)	6	252.075	A
7(1)	6	251.648	A
7(6)	6	235.221	B
2(10)	6	213.154	C
7(10)	6	211.191	C D
1(6)	6	202.102	C D E
1(10)	6	200.135	C D E F
6(10)	6	199.439	D E F G
3(6)	6	196.872	E F G H
2(6)	6	195.642	E F G H
1(3)	6	194.734	E F G H I
4(10)	6	191.736	E F G H I J
4(6)	6	188.976	E F G H I J
2(3)	6	188.133	F G H I J
6(6)	6	186.285	G H I J K
3(10)	6	185.897	G H I J K L
6(1)	6	184.278	H I J K L M
6(3)	6	183.327	H I J K L M
3(3)	6	181.618	I J K L M N
5(10)	6	179.845	J K L M N O
1(1)	6	173.565	K L M N O P
5(3)	6	172.580	L M N O P
3(1)	6	172.511	L M N O P
5(1)	6	171.615	M N O P
5(6)	6	171.426	M N O P
2(1)	6	168.726	N O P
4(1)	6	166.624	O P
4(3)	6	163.350	P

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En las figuras 11, 12 y 13 se muestra el crecimiento de la bacteria 6 a 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs respectivamente. En el anexo 2 se pueden ver el crecimiento de cada una de las bacterias.

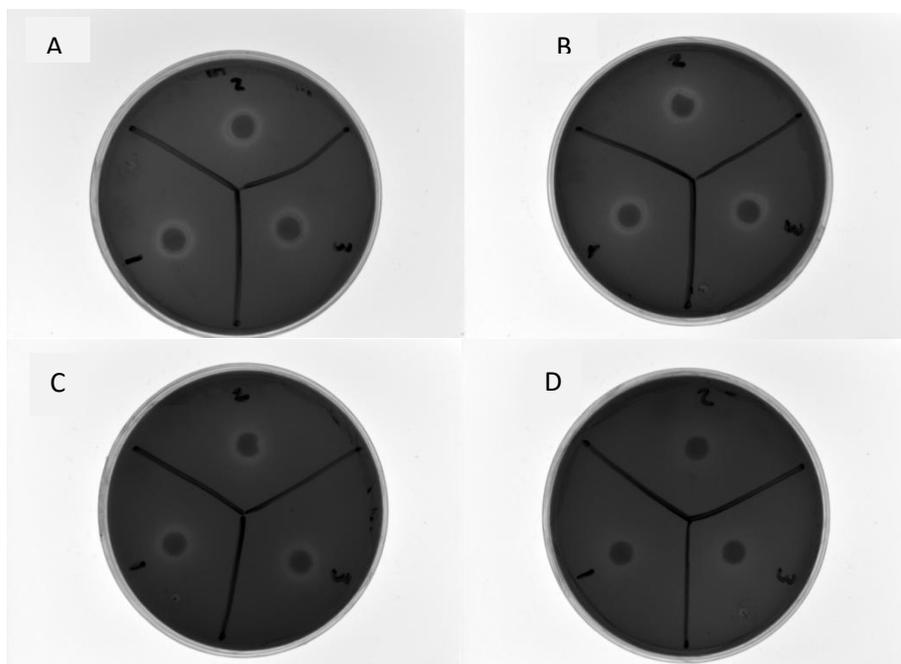


Figura 10. Bacteria 6 con 24 hr de incubación: A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .

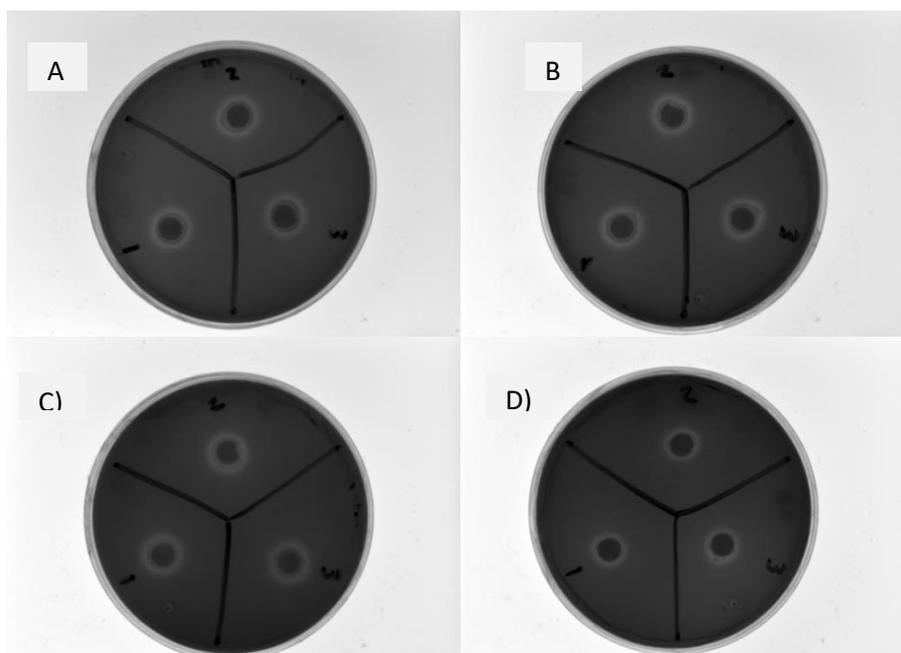


Figura 11. Bacteria 6 con 48 hr de incubación: A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .

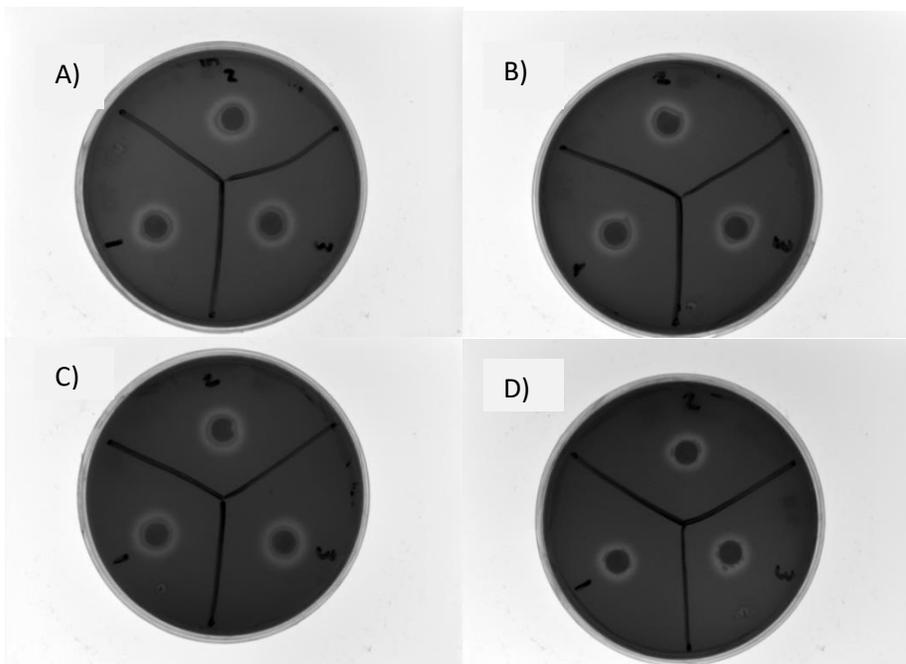


Figura 12. Bacteria 6 con 72 hr de incubación: A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .

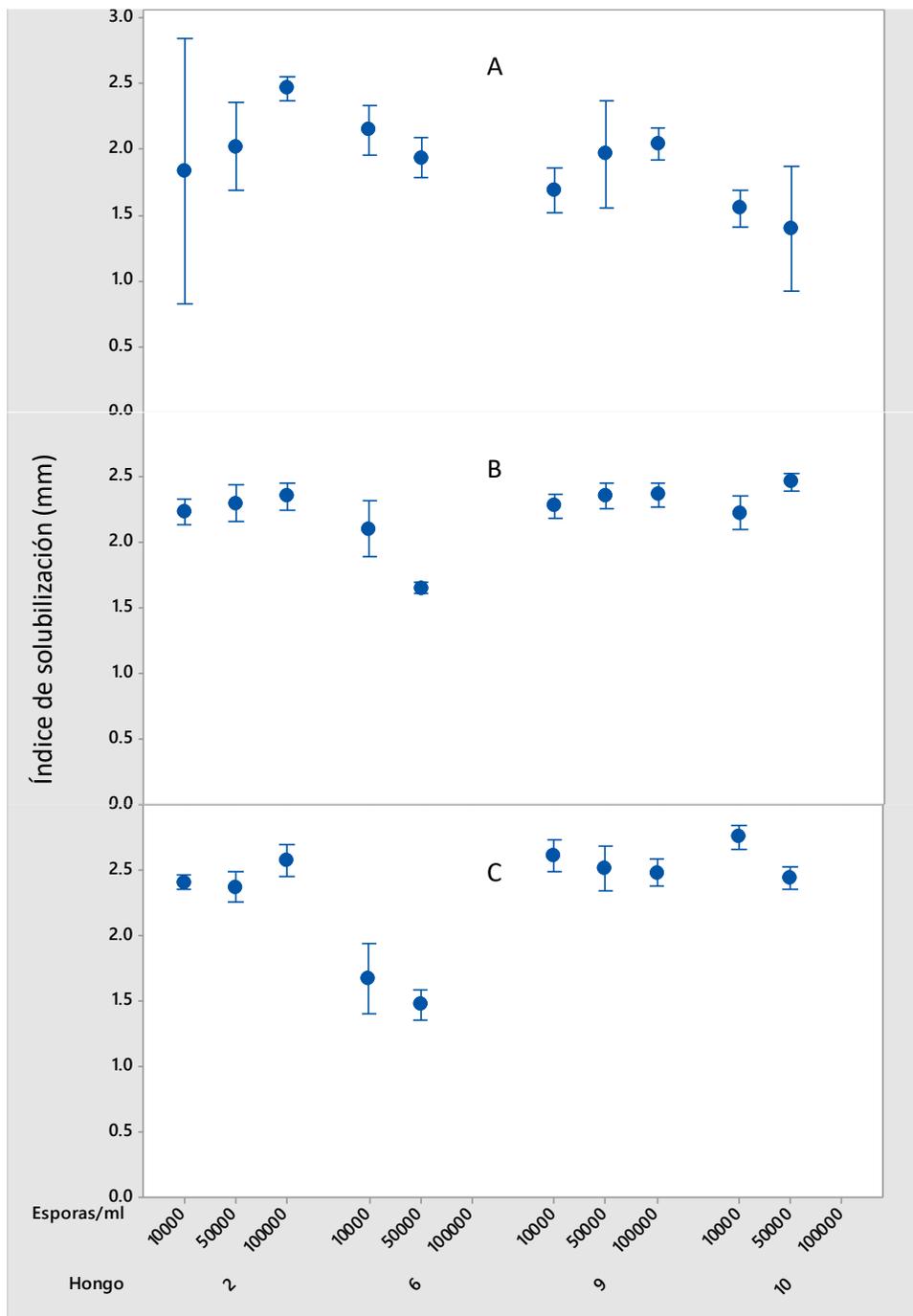
1.3. Hongos aislados

1.3.1. Índice de solubilización de fosfatos en hongos (I.S.).

Para el caso de los hongos, es importante mencionar que a las 24 hrs de incubación ninguna cepa evaluada presento ERS. En la gráfica 3, tabla 9, se puede observar que en el índice de solubilización a las 48 hrs se resalta que las cepas 2 y 9 presentaron los índices de solubilización mayores conforme se incremento la concentración de esporas, contrario a lo que muestran las cepas 6 y 10 las cuales presentaron los mayores I.S. conforme decrece la concentración de esporas en el medio de crecimiento.

A las 72 hrs la cepa 10 fue la única que cambio su comportamiento presentando incluso el mayor I.S. (2.47) con una mayor concentración de esporas/ml, en comparación de las demás cepas evaluadas.

Finalmente a las 120 hrs de incubación nuevamente la cepa 10 cambia su comportamiento, presentando ahora el mayor I.S. con 2.76 con respecto a las demás cepas pero en este caso particular a la menor concentración evaluada de 10000 esporas/ml. Con estos resultados obtenidos en el presente ensayo se podría inferir que el tiempo es un factor clave del I.S., ya que en este estudio se obtuvo un I.S. de hasta 2.7 en 5 días comparado con lo reportado por Rashid et al., (2004) donde mencionan que a los 7 días de incubación se obtuvieron IS de 2.8 y 2.7 en hongos como el *Aspergillus sp* y *Penicillium sp* respectivamente. Por otra parte Pulido & Niño (2015) y Lara, et al., (2011) mencionan que la capacidad solubilizadora de los hongos está relacionada con la especie de la cepa y la relación que existe entre el tamaño del micelio con la actividad solubilizadora. Lo que podría explicar el comportamiento observado con respecto al tiempo-cepa-concentración de las cepas evaluadas en el presente estudio.



Gráfica 3. Índice de solubilización de hongos (2, 6, 9 y 10) y concentraciones (10 000, 50 000 y 100 000) donde A) 48 hrs de incubación; B) 72 hrs de incubación y; C) 120 hrs de incubación.

Tabla 9. Datos de media de índices de solubilización.

Hongo	Esporas/ml	índice de solubilización (mm)		
		48 hrs	72 hrs	120 hrs
10	10 000	1.55	2.23	2.76
	50 000	1.39	2.47	2.45
9	10 000	1.68	2.28	2.62
	50 000	1.96	2.30	2.52
	100 000	2.03	2.37	2.58
6	10 000	2.14	2.10	1.67
	50 000	1.93	1.65	1.47
2	10 000	1.83	2.23	2.41
	50 000	2.01	2.30	2.37
	100 000	2.45	2.35	2.58

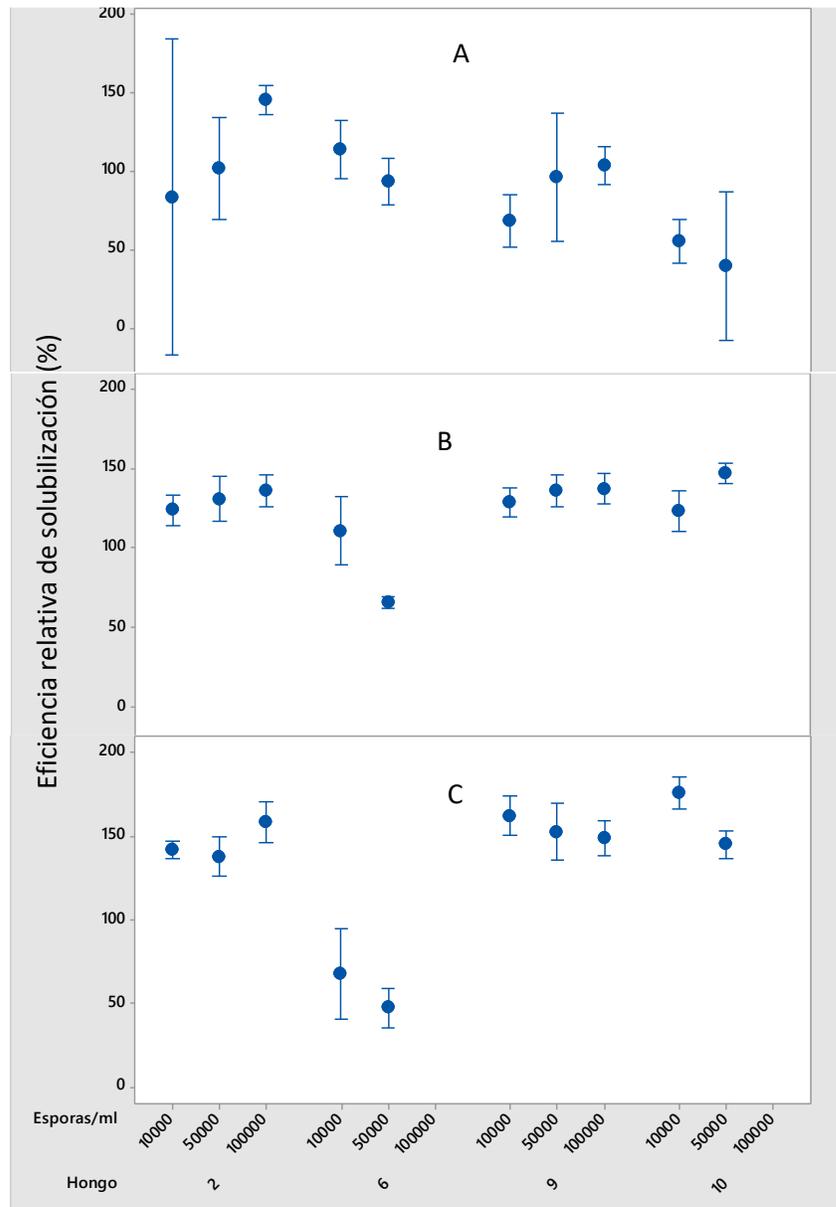
*Tabla con datos de medias de derivaciones estandar obtenidas del analisis estadistico por el metodo de Fisher de índices de solubilización en hongos. En rojo se presentan los indices mas altos obtenidos para 48 hr, 72 hr y 120 hr.

1.3.2. Eficiencia relativa de solubilización de fosfatos en hongos (ERS).

Se puede observar que para el ERS los valores obtenidos son similares a los obtenidos en el I.S. donde a las 48 hrs de incubación observando en la gráfica 4, tabla 10, que el H2 comparado con las demás cepas presentó el valor máximo de ERS de 145.87%.

Por el contrario, a las 72 hrs y 120 hrs el H10 es la cepa con mayor ERS obteniendo valores de 147.05% en la concentración de 50000 esporas/ml y 176.16% con una concentración de 10000 esporas/ml, respectivamente. Por su parte, Pulido & Niño (2015) reportaron valores de hasta 406.9% en hongos obtenidos a partir de la rizosfera de un cultivo de banano; estos datos son muy similares a los obtenidos por Hernández, et al (2011) quien reporto ERS de 305% en *Paecilomyces lilacinus*. Mientras que para el hongo *Penicilium sp*, a partir de la rizosfera del cacahuate en un estudio realizado por Gómez & Zabala (2001) obtuvieron ERS de 104.9% y 119.5%; por el contrario en un estudio realizado por Useche, et al (2004) utilizando la misma cepa pero en tres suelos del amazonas mencionaron ERS de 300% hasta 420%. Posada, et al., (2013) y Pulido & Niño (2015) mostraron ERS de 208% y 202.5%

respectivamente en el hongo *Fusarium sp.* En cepas colectadas en suelos de cultivo de café, resaltar que estas ERS se presentaron con periodos de incubación mayores a 10 días. Lo que concuerda con lo mencionado por Banik & Dey (1983), donde mencionan que la cantidad de fósforo solubilizado aumenta tras la esporulación de los hongos (mayor periodo transcurrido de tiempo), ya que este proceso demanda más fósforo para llevarse a cabo. Además cabe destacar que los datos reportados en la bibliografía anteriormente mencionada fueron realizados con suelos extraídos de cultivos intensivos tradicionales en climas tropicales o subtropicales; resaltando entonces que las ERS obtenidas (145.87% y 176.16%) de los hongos evaluados en este estudio son eficiencias relativamente altas si se toma en cuenta que se trabajó con suelos obtenidos de vegetación silvestre en ambientes desérticos.



Gráfica 4. Eficiencia relativa de solubilización en hongos (2, 6, 9 y 10) y concentraciones (10 000, 50 000 y 100 000) donde A) 48 hr de incubación; B) 72 hr de incubación y; C) 120 hr de incubación.

Tabla 10. Datos de media de eficiencia relativa de solubilización.

Hongo	Esporas/ml	Eficiencia relativa de solubilización (%)		
		48 hr	72 hr	120 hr
10	10 000	55.11	123.18	176.16
	50 000	39.36	147.05	145.05
9	10 000	68.67	128.87	162.14
	50 000	96.27	136.25	152.59
	100 000	103.44	137.37	148.97
6	10 000	114.23	110.86	67.97
	50 000	93.35	65.71	37.56
2	10 000	83.59	123.93	141.76
	50 000	101.83	130.76	137.87
	100 000	145.87	135.81	158.32

*Tabla con datos de medias de derivaciones estandar obtenidas del analisis estadistico por el metodo de Fisher con los datos de eficiencias de solubilización en hongos. En rojo se presentan los indices mas altos obtenidos para 48 hr, 24 hr y 120 hr.

1.3.3. Análisis de varianza para I.S. en hongos.

Análisis de Varianza para índice de solubilización

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	p>F
Hongo (Esporas/ml)	7	8.5486	1.22122	71.31	0.000
Error	50	0.8563	0.01713		
Total	59	10.3097			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.130863	91.69%	90.20%	88.04%

El análisis estadístico muestra que se tienen diferencias significativas donde la cepa 6 es muy diferente en comparación a las demás cepas. Esto se corrobora con el método de Fisher.

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Hongo (Esporas/ml)	N	Media	Agrupación
10 (10000)	6	2.76126	A
9 (10000)	6	2.62146	A B
2 (100000)	6	2.58321	B C
9 (50000)	6	2.52599	B C D
9 (100000)	6	2.48970	B C D
10 (50000)	6	2.45059	C D
2 (10000)	6	2.41769	D
2 (50000)	6	2.37845	D
6 (10000)	6	1.67972	E
6 (50000)	6	1.47568	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

1.3.4. Análisis de varianza para ERS en hongos.

Análisis de Varianza para Eficiencia Relativa de solubilización (ERS)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	p>F
Hongo(Esporas/ml)	7	85486	12212.2	71.31	0.000
Error	50	8563	171.3		
Total	59	103097			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
13.0863	91.69%	90.20%	88.04%

El análisis demuestra que existen diferencias significativas en la ERS entre hongos. Esto se corrobora con el método de Fisher. Donde el H6, vuelve a tener valores muy diferentes con respecto a las demás cepas.

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Hongo(Esporas/ml)	N	Media	Agrupación
10(10000)	6	176.126	A
9(10000)	6	162.146	A B
2(100000)	6	158.321	B C
9(50000)	6	152.599	B C D
9(100000)	6	148.970	B C D
10(50000)	6	145.059	C D
2(10000)	6	141.769	D
2(50000)	6	137.845	D
6(10000)	6	67.972	E
6(50000)	6	47.568	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En la figuras 14 se muestra el crecimiento del H10 a 48 hrs, 72 hrs y 120 hrs respectivamente. En el anexo 3 se pueden ver el crecimiento de cada uno de los hongos.

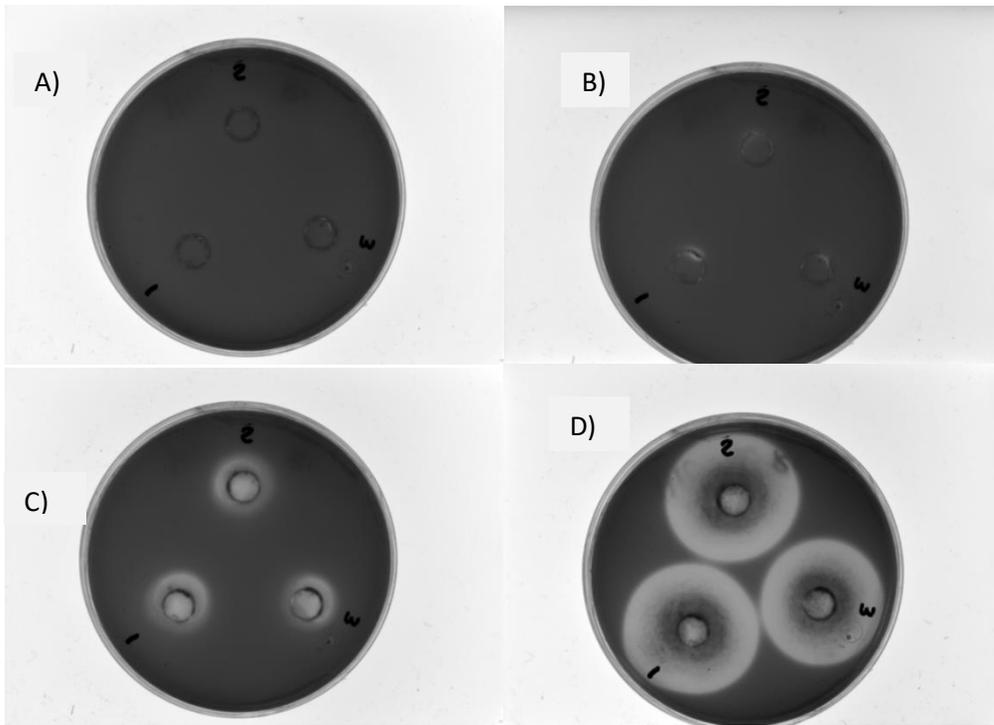


Figura 13. Muestras in vitro del hongo 10 con 10 000 esporas/ml. A) Hongo con 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación; C) 72 hr de incubación; D) 120 hr de incubación.

CONCLUSIONES

Con este estudio se puede concluir que la bacteria 7 presentó los valores más altos en los parámetros evaluados (I.S. y ERS).

La cepa 10 para el caso de los hongos resultó ser la mejor dentro de los parámetros evaluados (I.S. y ERS) en comparación a las demás cepas.

El trabajar con microorganismos obtenidos de suelos en condiciones semiáridas del norte del país, representa una oportunidad de aprovechamiento de este valioso recurso, esto debido a que la gran parte de los fertilizantes elaborados con MSF, son aislados de ambientes tropicales y suelen ser poco eficientes en condiciones semiáridas.

Para obtener un mayor conocimiento acerca de los MSF con los cuales se trabajó, se recomienda realizar un análisis taxonómico para identificar el género y especie de cada MSF y poder conocer de mejor manera su comportamiento; además, realizar un análisis de los factores fisicoquímicos (temperatura, humedad, etc.) y bioquímicos (pH, nutrientes, etc.) que afectan a los MSF para convertir el fósforo no asimilable a una forma asimilable; así mismo realizar un análisis detallado de los mecanismos utilizados por los microorganismos para solubilizar el fósforo (quelatación, ácidos orgánicos, intercambio de protones, etc.); y por último, conocer los efectos de estos MSF sobre diferentes cultivos.

RESUMEN

El fósforo (P) es un elemento esencial para el desarrollo de las plantas pero en los suelos al norte del país con pH alcalino se lixivian fácilmente con iones de Ca formando fosfato tricalcico ($3Ca_3(PO_4)_2$) haciendo el elemento poco soluble para estas. En este estudio se trabajó con microorganismos extraídos de suelos semi áridos de los cuales se obtuvieron 7 bacterias y 4 hongos con capacidad solubilizadora de fosfatos, los cuales convierten el fósforo de forma insoluble a formas solubles para la planta. En el caso de las bacterias, se realizaron diluciones de 10^1 , 10^2 , 10^3 ... 10^{10} , con las que se eligieron las diluciones 10^0 , 10^3 , 10^6 y 10^{10} para conocer su índice de solubilización (I.S.), mostradas en las Grafica 1, en la cual la bacteria 7 en las diluciones 10^0 y 10^3 presento los índices más altos desde las primeras 24 hrs hasta las 72 hrs de incubación, siendo de 2.3 a 3.5, respectivamente; con los hongos se realizaron pruebas con 10 000 esporas/ml, 50 000 esporas/ml para todos los hongos y de 100 000 esporas/ml para los hongos 2 y 9 (la cantidad de ml aplicadas en los H6 y H10, provocaba contaminación en las demás unidades), donde el hongo con mayor I.S. fue el H10 manteniéndose de 72 hrs a 120 hrs con 2.5 y 2.8 con 50 000 esporas/ml y 10 000 esporas/ml respectivamente. Además se realizó la prueba de Eficiencia Relativa de Solubilización de fosfatos (ERS) en las bacterias, donde la bacteria 7 con dilución 10^3 obtuvo una ERS de 252.07% mucho mayor en comparación con las demás bacterias; en el caso de los hongos la eficiencia relativa de solubilización (ERS) se obtuvieron resultados a partir de 48 hrs donde en este caso el H2 obtuvo la mayor ERS con 146% con 100 000 esporas/ml, pero a partir de 72 hrs a 120 hrs el H10 muestra la mejor ERS con 147% y 176% con 50 000 esporas/ml y 10 000 esporas/ml respectivamente.

Palabras clave: microorganismos, fósforo, guayule (*Parthenium argentatum*), solubilización de fósforo, hongos, bacterias, suelos, Índice de solubilización (IS), eficiencia relativa de solubilización (ERS).

BIBLIOGRAFÍA

Achal, V., Savant, V. & Reddy, M., 2007. Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubugensis*, *Soil. Biol. Biochem*, Volume 39, pp. 695-699.

Aftab, A. & Asghari, B., 2008. Rhizobium and Phosphate Solubilizing Bacteria Improve the Yield and Phosphorus Uptake in Wheat (*Triticum aestivum*). *international journal of agriculture & biology* , 10(1), pp. 85-88.

Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M., 2008. Screening of free-living rhizobacteria for their multiple plant growth promoting activities.. *Microbiol. Res.*, Issue 163, pp. 172-181.

Anon., 2016. *BioEnciclopedia*. [Online]
Available at: <http://www.bioenciclopedia.com/ciclo-del-fosforo/>
[Accessed 05 abril 2017].

Arencibia, D., Rosario, L. & Gámez, R., 2008. <https://www.researchgate.net>. [Online]
Available at: [:https://www.researchgate.net/publication/262724715](https://www.researchgate.net/publication/262724715)
[Accessed Enero 2018].

Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C. & Standing, D., 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. Isolated from tomato rhizosphere.. *Australian Journal of crop science*, 4(6), pp. 378-383.

Banik, S. & Dey, B., 1983. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms.. *Plant and Soil*, Volume 69, pp. 353-364.

Behera, B. et al., 2013. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangroove. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18 september, 3(2), pp. 97-110.

Bertoni, G. & Morard du L, P., 1988. Dynamique de l'absorption de elements minera x l'ail (*Allium sativum* L.).. *Agrochimica*, 5-6(32), pp. 519-530.

Biavati, G. & Fernandez, J., 2012. *Kemira GrowHow*. [Online]
Available at: www.horticom.com/pd/imagenes/55/871/55871.pdf
[Accessed 22 septiembre 2017].

Bobadilla, C. & Rincon, S., 2008. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido a partir de residuos de plaza (tesis de grado Microbiología Industrial).. *Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá* .

Cantu, D., Rodriguez, R. & Angulo, J., 1996. crecimiento estacional de guayule, características de rendimiento de hule y resina bajo condiciones naturales. *Zonas Aridas*, pp. 235-243.

Chen, W., Yang, F., Zhang, L. & Wang, J., 2016. Organic Acid Secretion and Phosphate Solubilizing Efficiency of *Pseudomonas* sp. PSB12: Effects of Phosphorus Forms and Carbon Sources. *Geomicrobiology Journal*, 33(10), pp. 870-877.

Chen, Y. et al., 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities.. *Applied Soil Ecology* , Volume 34, pp. 33-41.

CONABIO, 2009. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. [Online]

Available at: <https://www.google.ca/search?client=firefox-b-ab&dcr=0&btnG=Buscar&q=conabio+guayule#>

[Accessed julio 2017].

Consultora Agroestrategias, 1987. *Agroestrategias consultores*. [Online]

Available at: <http://agroestrategias.com/index.php?acc=4>

[Accessed septiembre 2017].

Datta, M. et al., 2011. Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of Chilli (*Capsicum annum* L.) under field conditions.. *Australian Journal of Crop Science*, Volume 5, p. 531–536.

Delgado, M. et al., 2014. Characterization of phosphatesolubilizing bacteria isolated from the arid soils of a semi-desert region of north-east Mexico. *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems* , pp. 1-7.

Di Barbaro, G., Pernasetti, S. & Joratti, M., 2009. ¿Qué son y que rol juegan los microorganismos en el ambiente y en la fertilidad de los suelos?. *Revista de Divulgacion Agricola y Agroindustrial*.

Fankem, H. et al., 2006. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon.. *African Journal of Biotechnology*, 5(24), pp. 2450-2460.

FAO, 2010. *Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la Agricultura*. [Online]

Available at: <http://www.fao.org/soils-portal/about/definiciones/es/>

[Accessed 29 septiembre 2017].

Fernandez, C., 2014. *ecoavant.com*. [Online]
Available at: <http://www.ecoavant.com/es/notices/2014/01/el-fosforo-se-acaba-1910.php>
[Accessed marzo 2018].

Fixen, P., 2009. *World fertilizer nutrient reserves. Simposio de fertilidad de suelos.* Rosario, Argentina, F. Garcia.

Flores, M. Á. C., 2010. *Info Agro*. [Online]
Available at:
http://www.infoagro.com/hortalizas/microorganismos_beneficiosos_cultivos.htm
[Accessed septiembre 2017].

García, R., Lovaisa, N. & Ulla, E., 2015. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). *Revista Agronomica Noroeste Argentina*, Volume 35, pp. 19-28.

Garcia, S. & Alvarez, P., 1999. *Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcareos del valle del mantaro*, Loja, Ecuador: s.n.

Gómez, Y. & Zabala, M., 2001. Determinación de la capacidad solubilizadora del p en hongos aislados de la rizósfera del mani (*Arachis hypogaea* L.). *yirma gómez-Guiñán Y Magalis Zabala, Universidad de Oriente, Venezuela*, 13(1), pp. 8-13.

Gross, T., Faull, J., Ketteridge, S. & Springham, D., 1995. *Introductory microbiology*. London, United Kingdom: Chapman and Hall.

Gyaneshwar, P. et al., 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and soil*, Issue 245, pp. 83-93.

Hernandez-Leal, T., Carrion, G. & Heredia, G., 2011. Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, Volume 45, pp. 881-892.

Holguin Sterling, L., 2015. *slideshare*. [Online]
Available at: <https://es.slideshare.net/achelhs/microorganismos-de-importancia-agrcola>
[Accessed septiembre 2017].

Iañez, E., 1998. *Hipertextos del área de la biología*. [Online]
Available at: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/25_micro.htm
[Accessed 29 Enero 2018].

- Jasso de Rodríguez, D. et al., 1993. Productivity and cytogenetic characteristics of guayule. Screening of plants from the Mapimi region.. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Volume 70, pp. 1229-1234.
- Jasso, D., Angulo, J. & Rodriguez, R., 1990. Guayule: relación entre producción de biomasa, síntesis de hule y condiciones climáticas. pp. 322-331.
- Khan, M., Zaidi, A. & Wani, P., 2007. Role of phosphate solubilizing microorganisms in agriculture. *Agron. Sustain*, Volume 27, pp. 29-43.
- Kucey, R., 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin alberta soils. *Reserch station, Agriculture Canada*, Volume 63, pp. 671-678.
- Kumar, V. & Narula, N., 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococum* mutants. *Biol Fertil Soils*, Volume 28, pp. 301-305.
- Kumar, V. & Narula, N., 1999. Solubilization of organic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococum* mutans Boil. *Fertile soils*, Volume 28, pp. 301-305.
- Lara, C., Esquivel, L. & Negrete, J., 2011. Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Cordoba-Colombia. *Biotechnologia en el sectro agropecuarioy agroindustrial*, 9(2), p. 114.120.
- Małgorzata, W., Agnieszka, S., Justyna, D.-I. & Katarzyna, C., 2016. Utilization of microorganisms in the solubilization of low-quality phosphorus raw material. *Ecological Engineering*, Volume 89, pp. 109-113.
- McClellan, G. & Kauwenbergh, S., 2004. world phosphate deposits. In use of phosphate rocks for sustainable agriculture. *FAO Land and water development division and the international atomic energy agency*.
- Muleta, D., Assefa, F., Börjesson, E. & Granhall, U., 2013. Phosphate- solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia.. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, Issue 12, pp. 72-84.
- Naik, P., Raman, G., Narayanan, K. & Natarajan, N., 2008. Assesment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil.. *BCM Microbiology* , 8(230), pp. 1-14.
- NIBHA, G. & SARITA, J. D., 2008. Phosphate Solubilising Fungi from Mangroves of Bhitarkanika, Orissa. *Journal of Biosciences*, junio, 15(2), pp. 90-92.

- Oliviera, C. et al., 2008. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil. Biol. Biochem*, Issue 41, pp. 1782-1787.
- Paredes, M. & Espinosa, D., 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfatos: una revisión crítica.. *Terra Latinoamericana*, 1(28), pp. 61-70.
- Paul, N. & Sundara, W., 1971. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. *Plant and Soil* , Issue 35, pp. 127-132.
- Pérez, A., De la ossa, J. & Montes, D., 2012. Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del departamento de Sucre.. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.*, 1(4), pp. 35-45.
- Pérez, E., Sulbaran, M., Ball, M. & Yarzabal, L., 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil. Biol. Biochem* , Volume 39, p. 2905–2914.
- Ponmurugan, P. & Gopi, C., 2006. Distribution pattern and screening of phosphate solubilizing bacteria isolated from different food and forage crops.. *Journal of Agronomy*, 5(4), pp. 600-604.
- Posada, R., Heredia, G., Sieverding, E. & Sánchez, M., 2013. Solubilization of iron and calcium phosphates by soil fungi isolated from coffee plantations. *Agronomy and Soil Science*, 59(2), pp. 185-196.
- Pulido, D. & Niño, J., 2015. *Aislamiento y evaluación de hongos solubilizadores de fosfatos asociados al sistema productivo de banano (musa paradisiaca) en zonas de los departamentos de magdalena, antioquia y cundinamarca, colombia*, Bogota, Colombia: Tesis.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N. & Alam, S., 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganism (PSM) Under in vitro conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(2), pp. 187-196.
- Restrepo, G. et al., 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), pp. 63-76.
- Rodriguez, F. et al., 2011. El guayule, *Parthenium argentatum* A. Gray (Asteraceae), asilvestrado en Almería (España).. *Anales de Biología*, 2(1), pp. 103-105.

- Rodríguez, H. & Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion.. *Research review paper. Biotechnology Advances* , Issue 17, pp. 319-339.
- Rodriguez, R., Cantu, D. & Angulo, J., 1996. Producción de guayule: respuesta de hule y biomasa al riego. *Zonas Áridas*, pp. 301-308.
- Rooney, D. & Clipson, N., 2009. Phosphate addition and plant species alters microbial community structure in acidic upland grassland soil. *Microb. Ecol*, Volume 57, pp. 4-13.
- Rubio, G., 2012. Conectando el fósforo del suelo con la planta. *Informaciones agronómicas del cono sur* , Volume 16, pp. 19-23.
- Saavedra, A., Real, A., Valdivieso, P. & Balvin, J., 2013. *Prezi.com*. [Online] Available at: <https://prezi.com/gu4848qrqaga/crecimiento-de-bacterias-bajo-diferentes-condiciones-de-temp/> [Accessed 19 Enero 2018].
- Shekar, C., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology letters*, pp. 265-270.
- SMART Fertilizer Management, 2017. *El fosforo en el suelo y las plantas*. [Online] Available at: <http://www.smart-fertilizer.com/es/articles/phosphorus>
- STOUT, D. I. & ARNON, 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. In: *plant physiology*. s.l.:s.n., pp. 371-375.
- Sylvia, M., Fuhrmann, J., Hartel, P. & Zuberer, D., 1995. Principles and applications on soil microbiology. *Prentice Hall*, Volume second edition, p. 640.
- Useche, Y., Valencia, H. & Hernando, P., 2004. Caracterización De bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el sur del trapecio amazonico. *Acta Biológica Colombiana*, 9(2), pp. 129-130.
- Vera, D., Pérez, H. & Valencia, H., 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae).. *Acta Biol. Colomb*, Volume 7, pp. 33-40.
- Zhiguang, L. et al., 2015. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology*, Volume 96, pp. 217-224.

ANEXOS

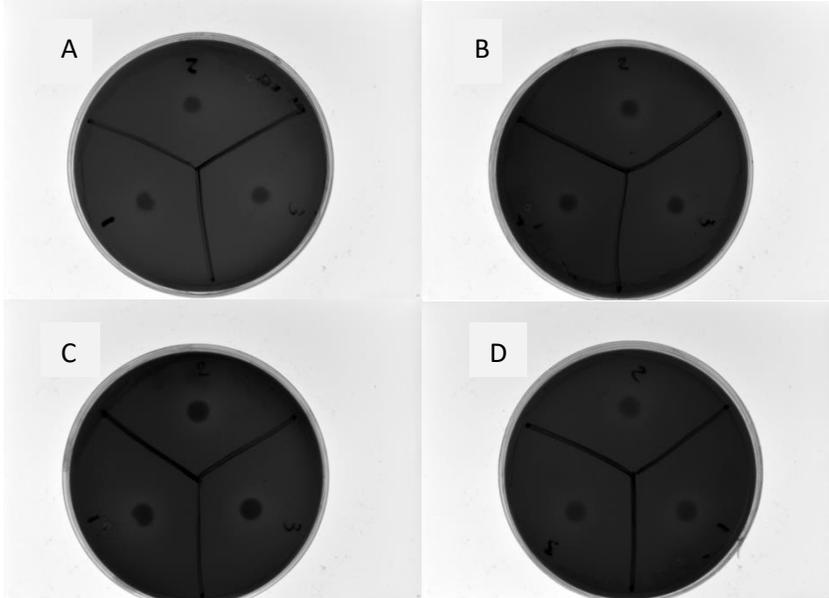
1. Etiquetas de muestras después de ser conservadas.

Lugar	Suelo	Total de pases	Total de unidades	Muestras conservadas	Nomenclatura al conservar	Observaciones
Durango	S-3	6	15	2	H5	Procede del hongo color rosado de forma llamativa, tiene esporas ovaladas. SAS*.
					H13	Hongo color verde, de desarrollo lento. SAS.
					H6	Esporas muy pequeñas con demasiado desarrollo de micelio. CAS*.
					H14	Esporas en forma de ovalada, SAS.
					B6	Con fuerte CAS.
San Luis Potosi	S-5	5	27	15	B7	Con fuerte CAS.
					H1	Gran cantidad de esporas, desarrollo rápido. CAS.
					H2	Gran cantidad de esporas, desarrollo rápido. CAS.
					H3	Gran cantidad de esporas, desarrollo rápido. CAS.
					H4	Posible alternaría. SAS.
					H5	Gran cantidad de esporas y micelio. CAS.
					H8	Buena cantidad de esporas. CAS.
					H9	CAS.
					H10	CAS.
					H11	Posible alternaría. SAS.
					H12	Gran cantidad de esporas y poco micelio. CAS.
					B1	Poca CAS.
					B2	Poca CAS.
B3	Poca CAS.					
B4	Poca CAS.					
B5	Poca CAS.					

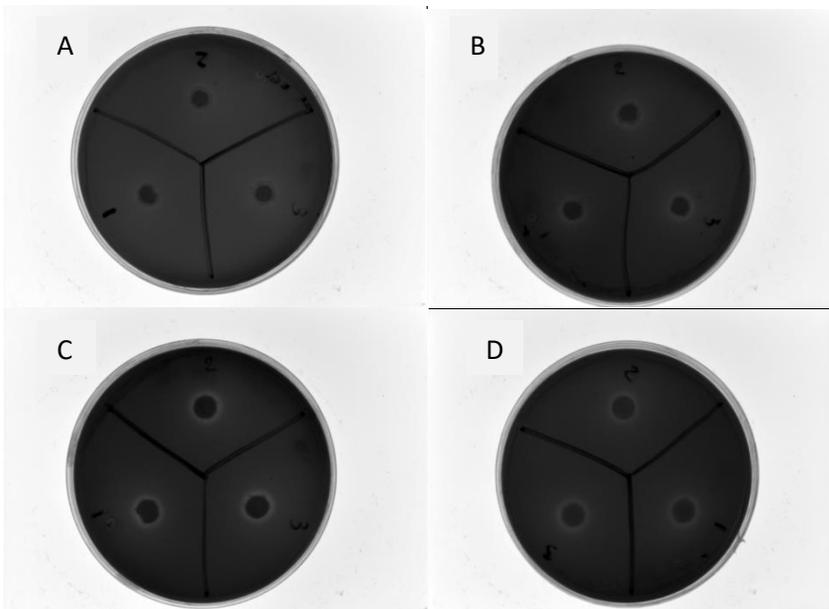
*CAS= CON CAPACIDAD SOLUBILIZADORA.*SAS= SIN CAPACIDAD SOLUBILIZADORA. H= HONGO. B=BACTERIA.

Nota: el suelo de San Luis Potosí S-6, tuvo hasta la tercera generación, con 23 unidades, de las cuales ninguna presento el halo indicativo de acción solubilizadora de fosforo.

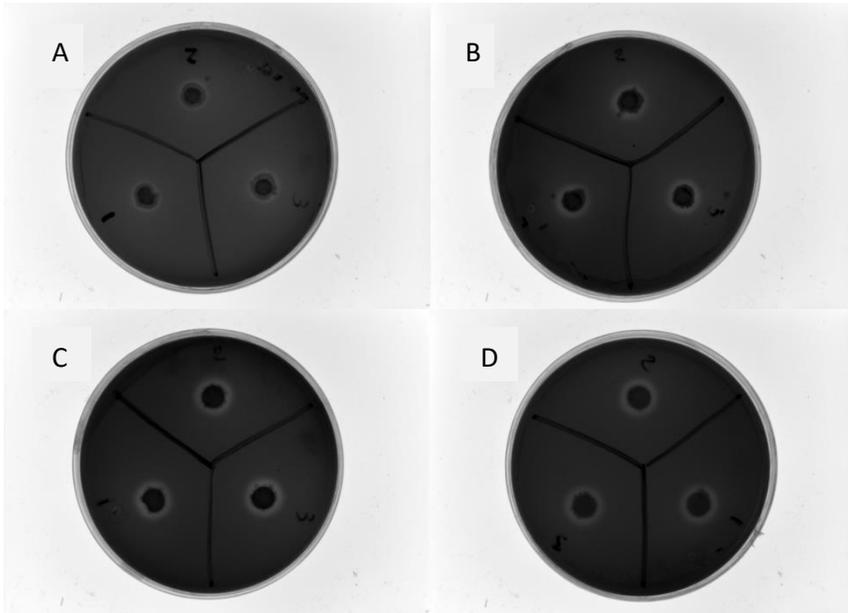
2. Diluciones por bacterias cada 24 hr.



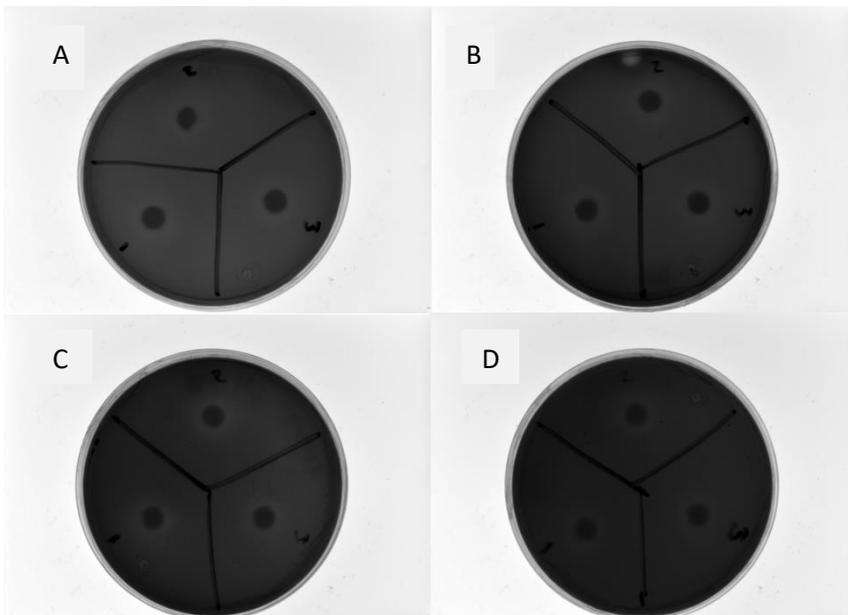
*Bacteria 1 con 24 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



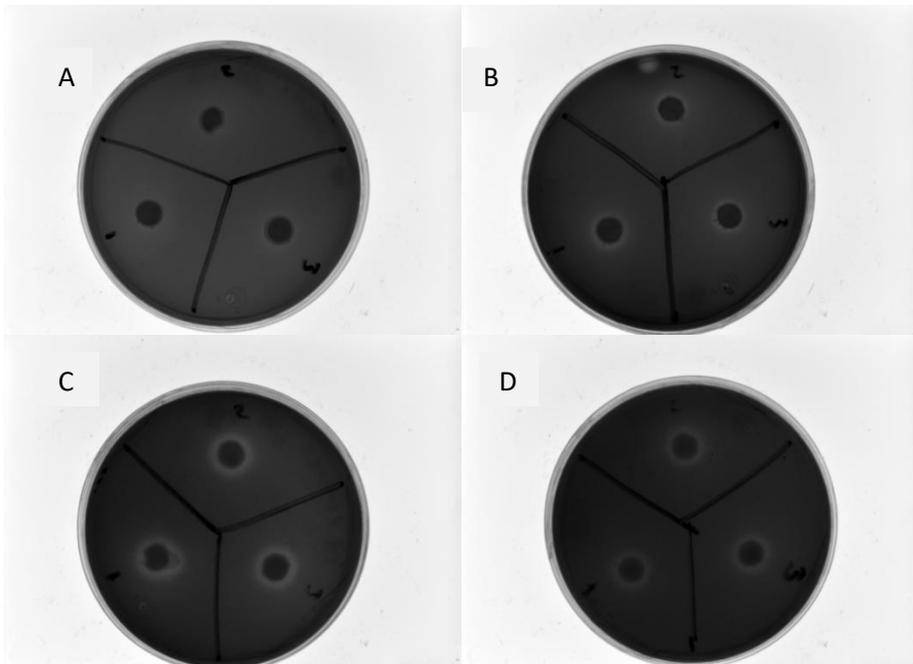
*Bacteria 1 con 48 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



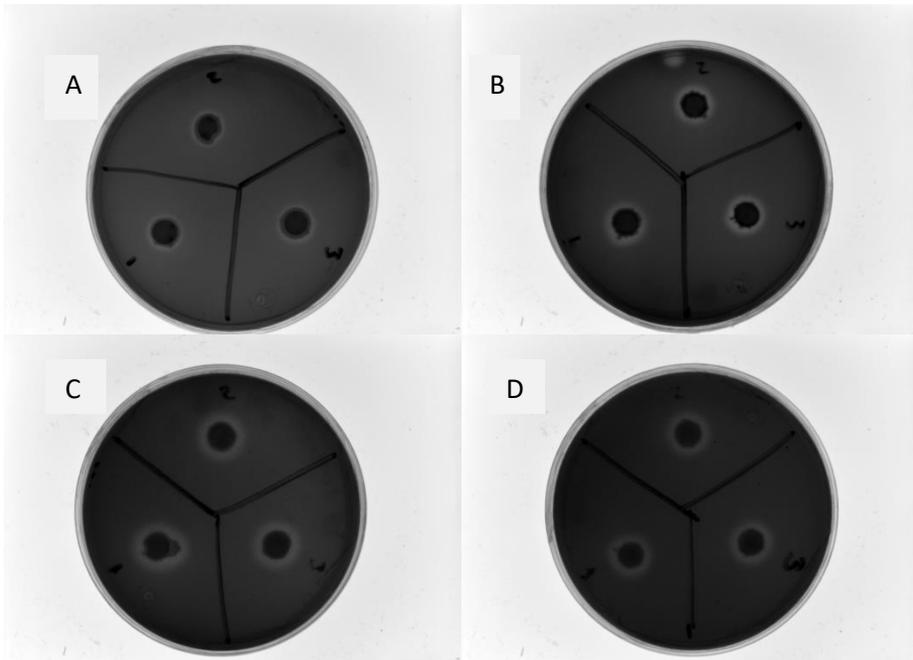
*Bacteria 1 con 72 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



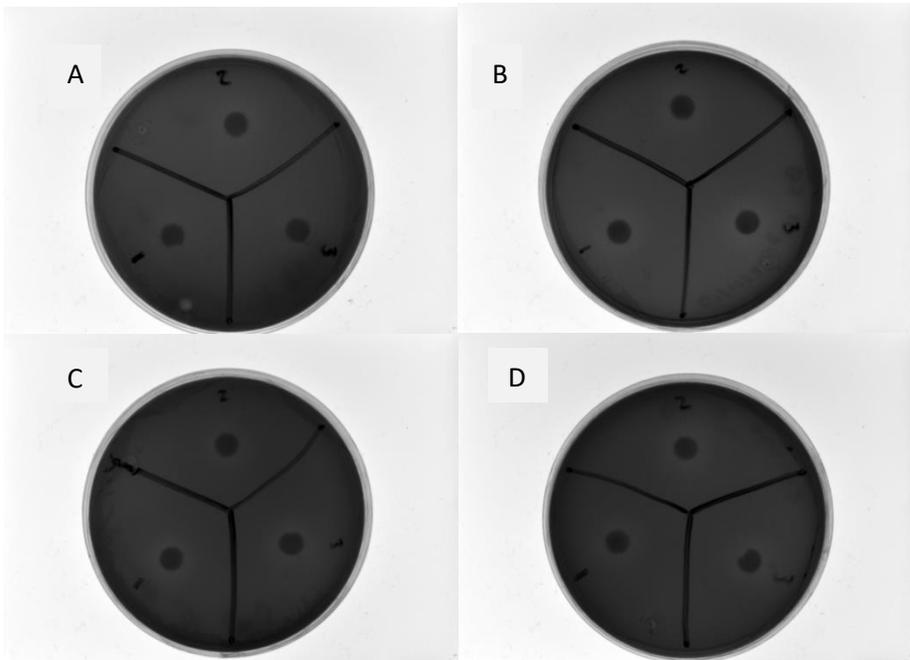
* Bacteria 2 con 24 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



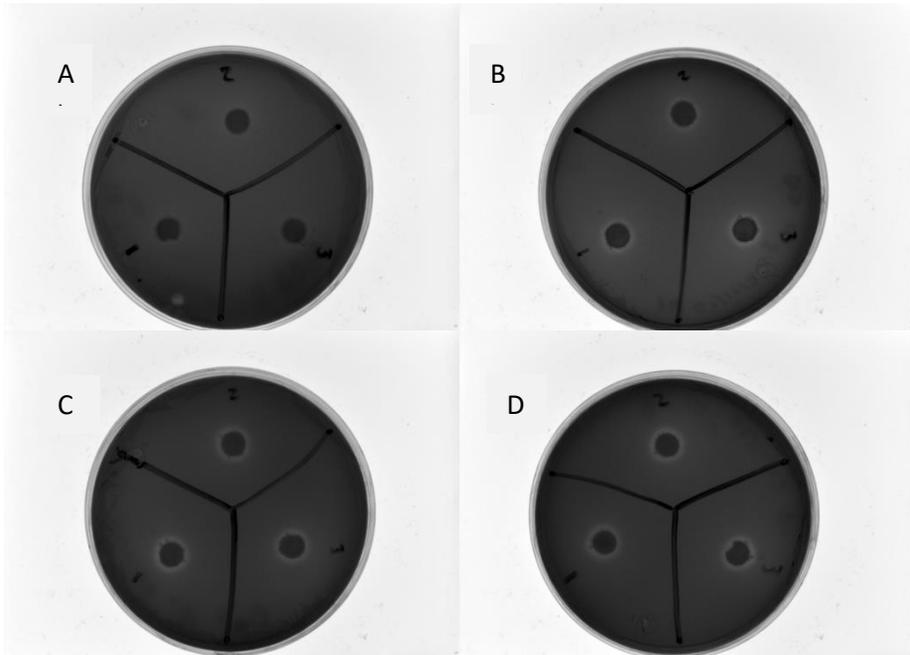
*Bacteria 2 con 48 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



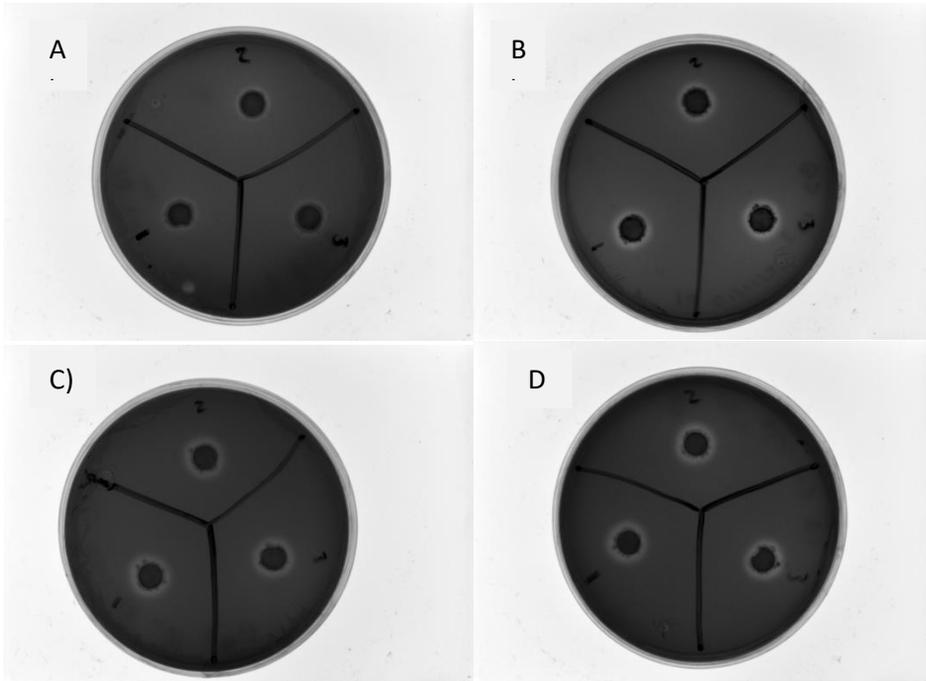
*Bacteria 2 con 72 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



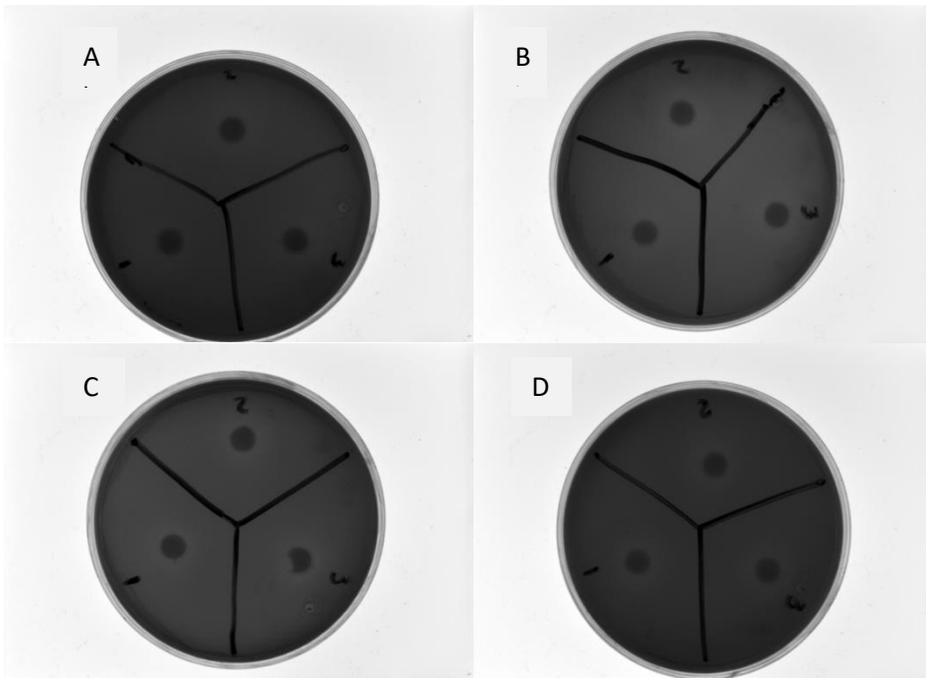
*Bacteria 3 con 24 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



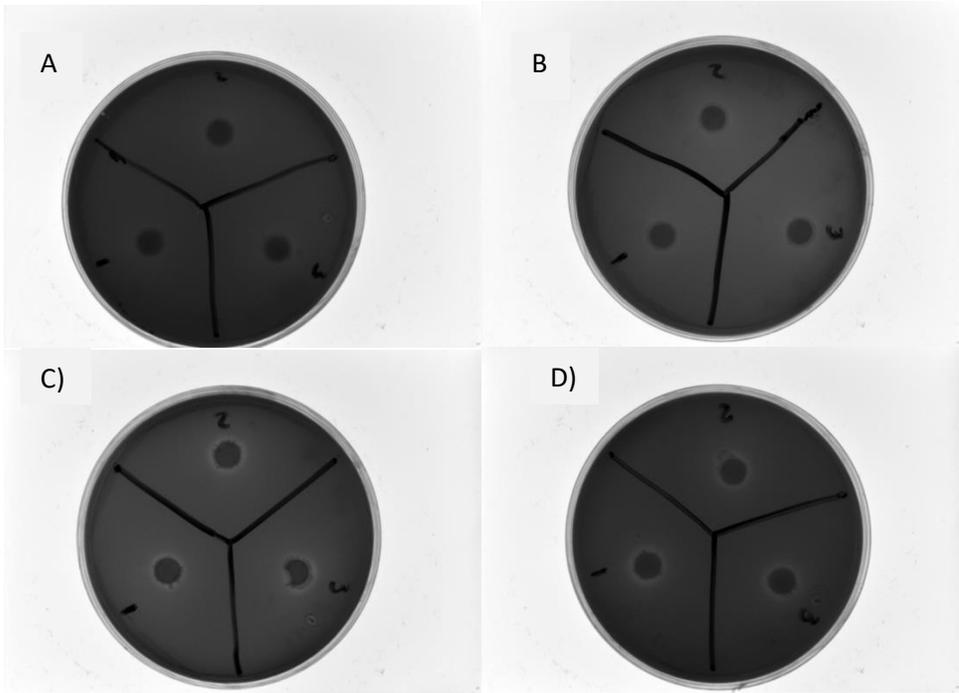
*Bacteria 3 con 48 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



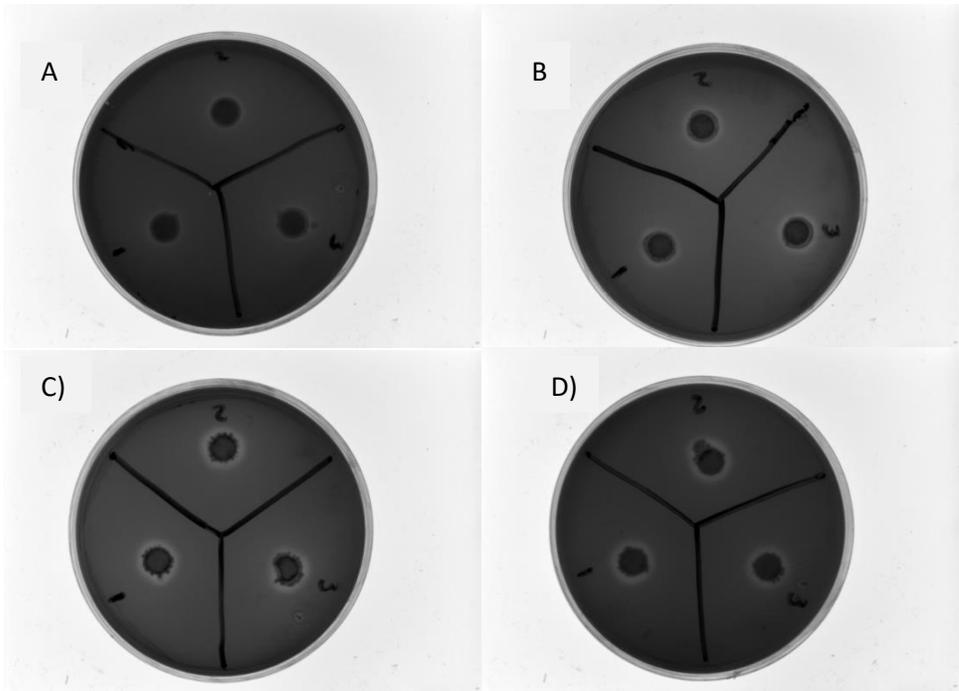
*Bacteria 3 con 72 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



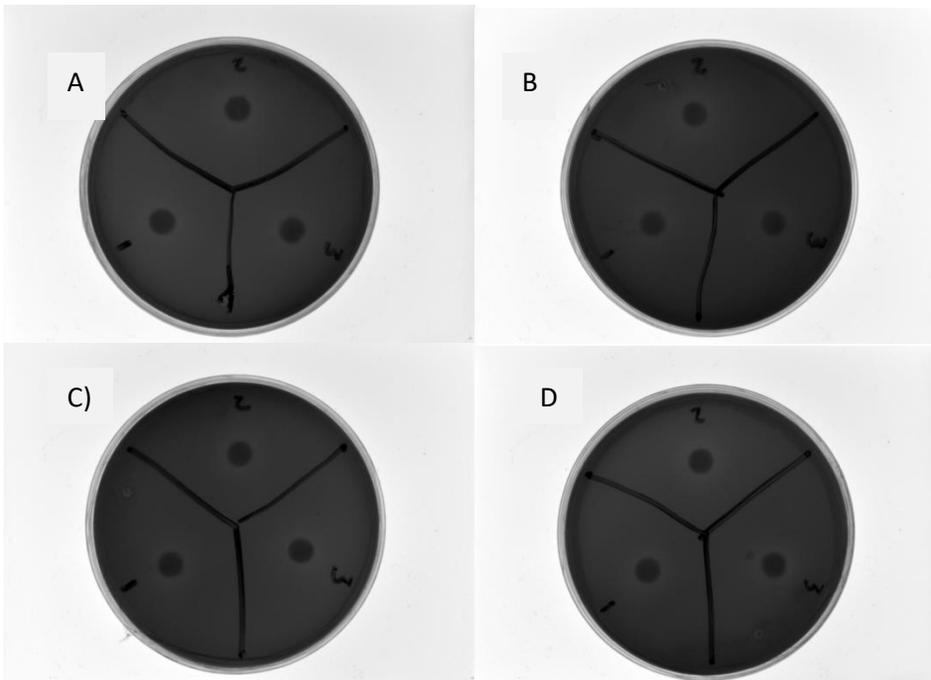
*Bacteria 4 con 24 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



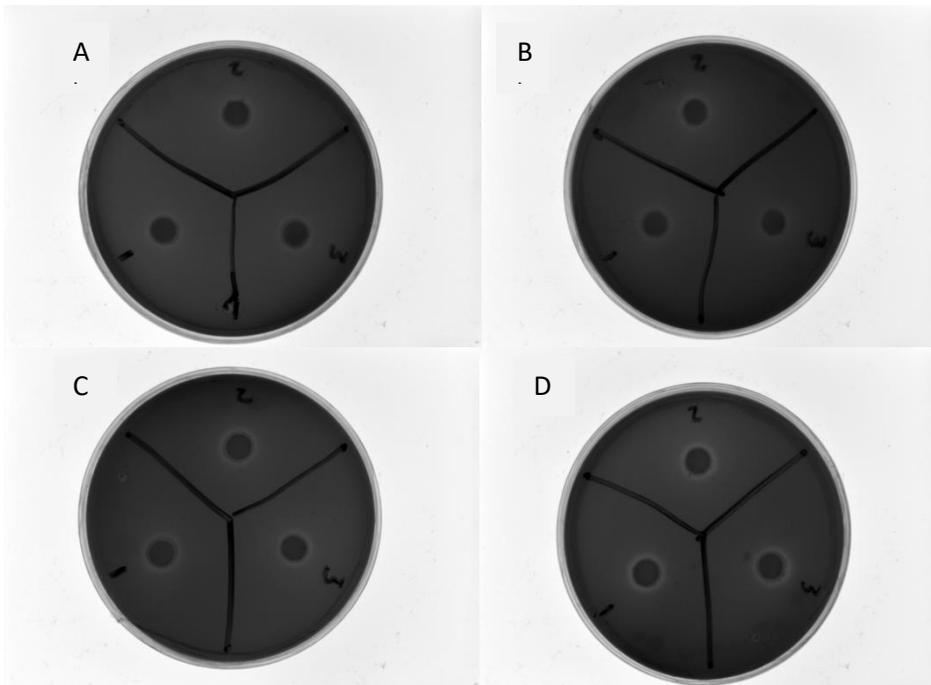
*Bacteria 4 con 48 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



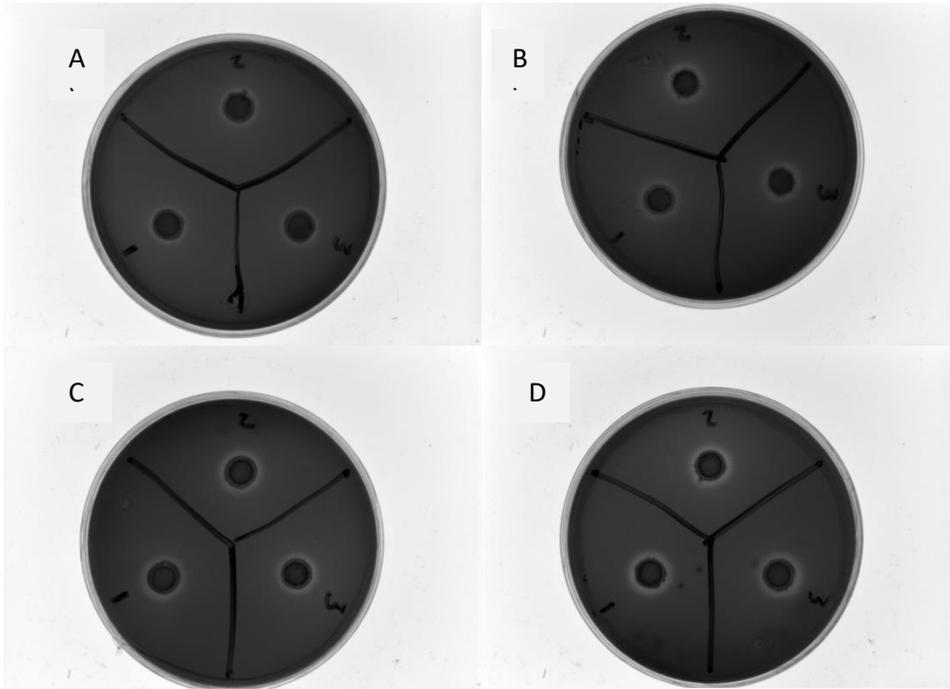
*Bacteria 4 con 72 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



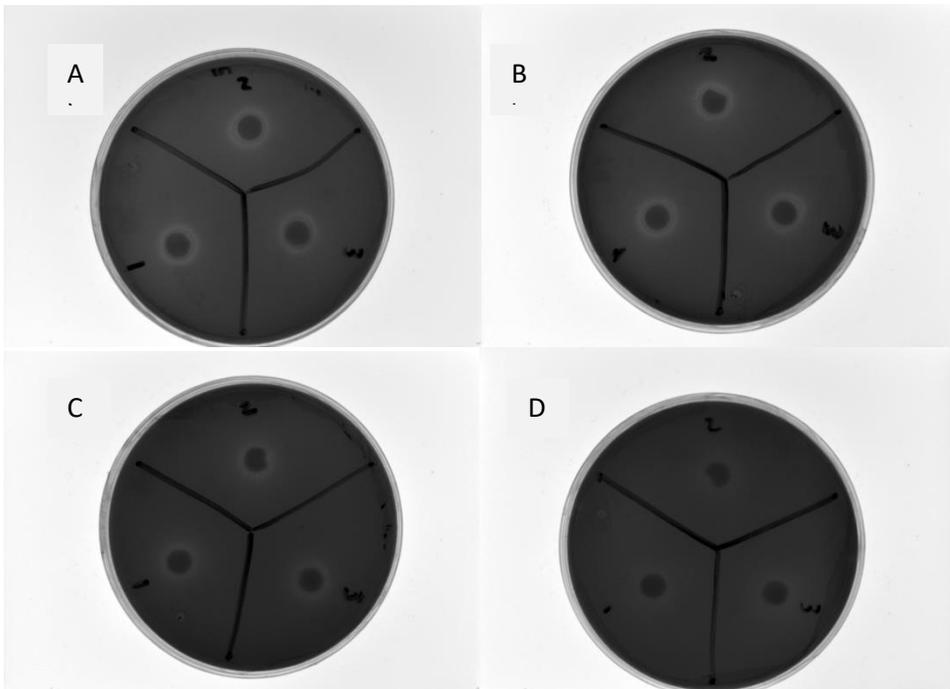
*Bacteria 5 con 24 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



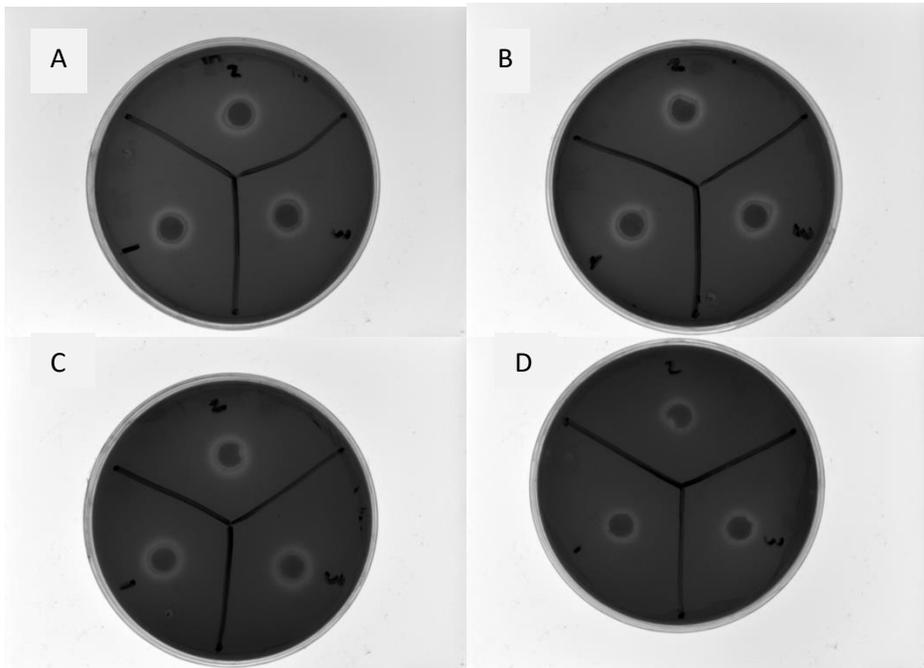
*Bacteria 5 con 48 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



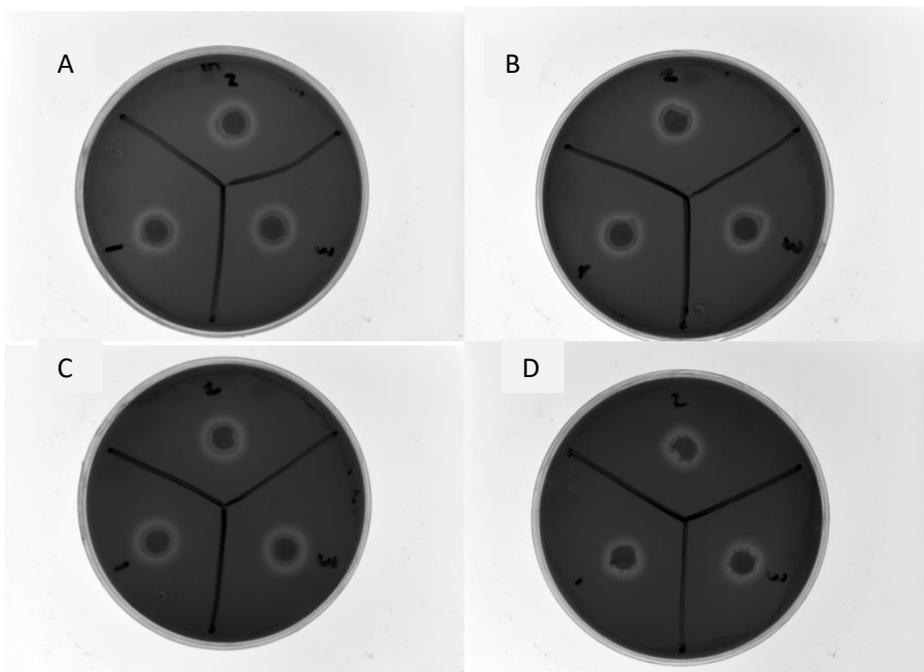
*Bacteria 5 con 72 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



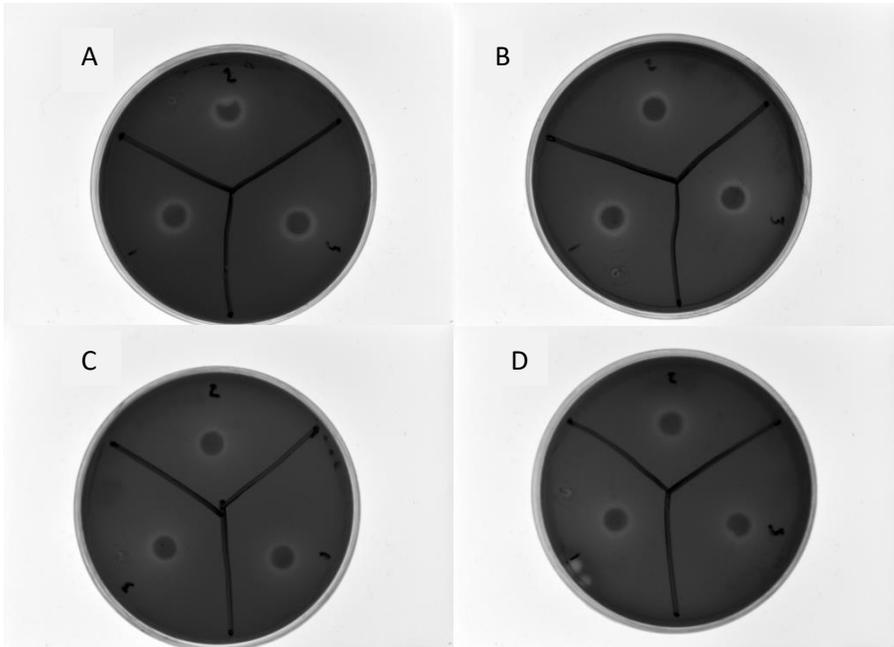
*Bacteria 6 con 24 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



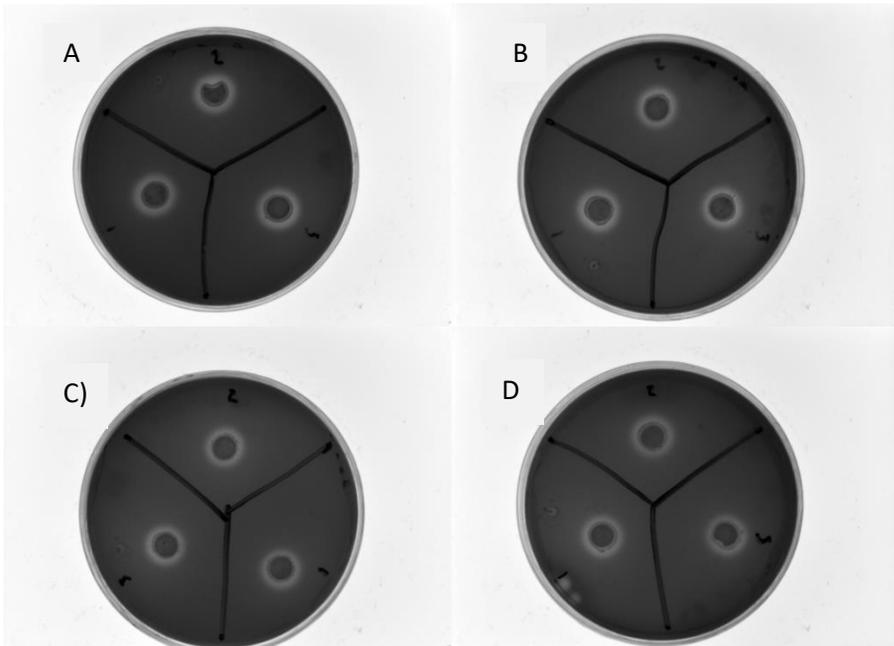
*Bacteria 6 con 48 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



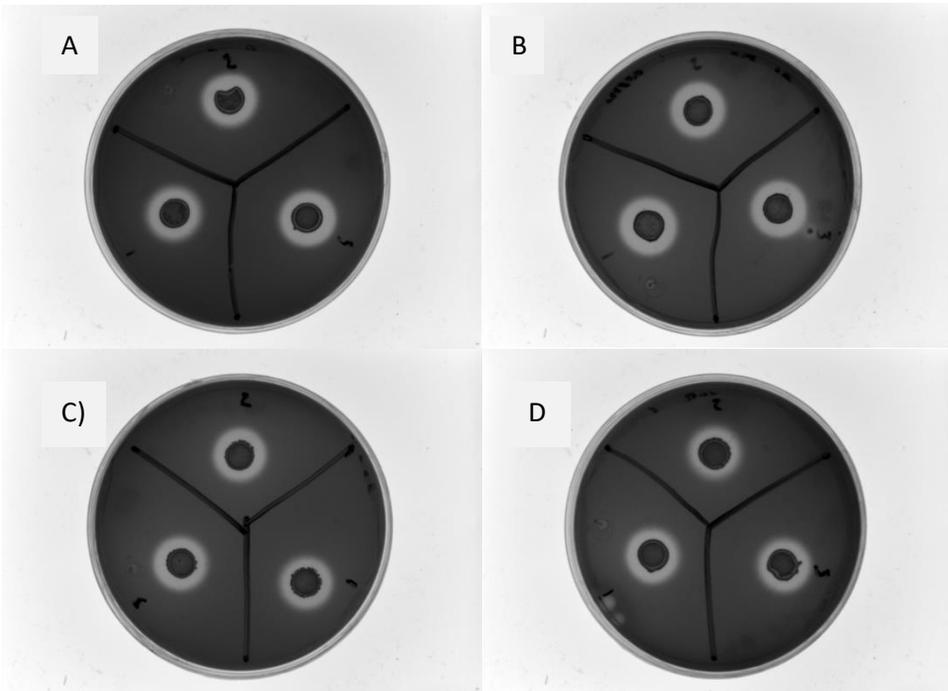
*Bacteria 6 con 72 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .



*Bacteria 7 con 24 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .

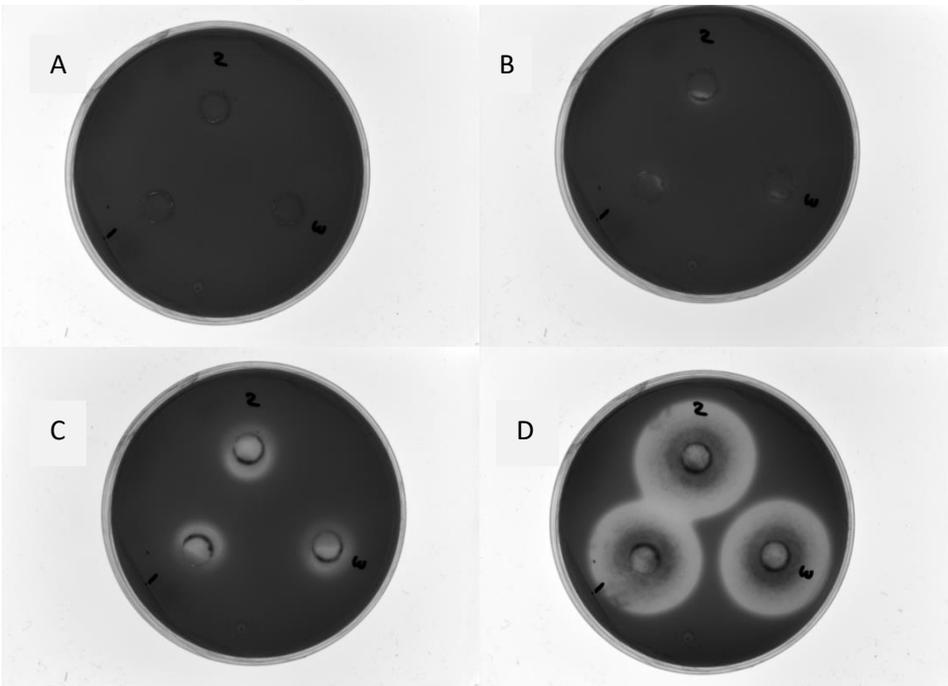


*Bacteria 7 con 48 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .

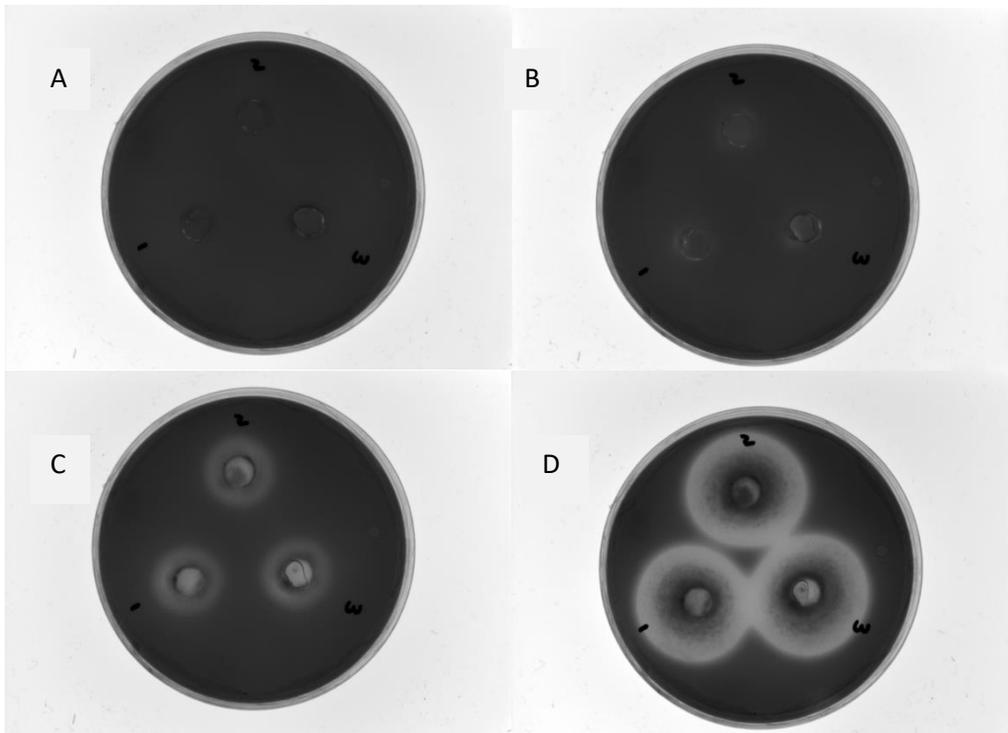


*Bacteria 7 con 72 hr de incubación; A) dilución 10^0 ; B) dilución 10^3 ; C) dilución 10^6 ; D) dilución 10^{10} .

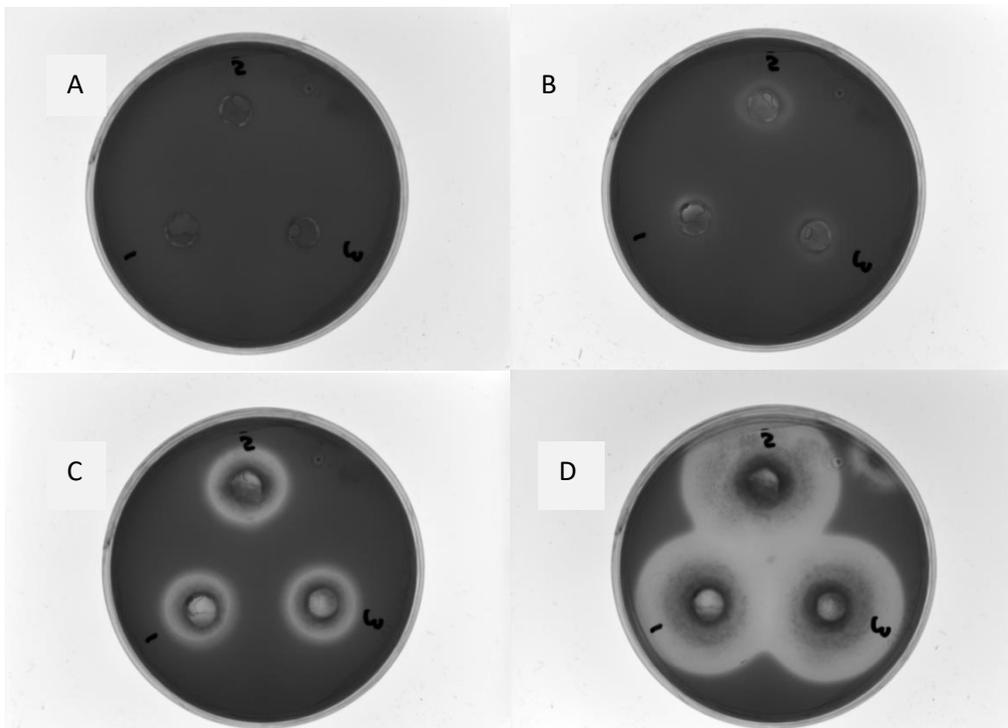
3. Muestras de hongos cada 24 hr.



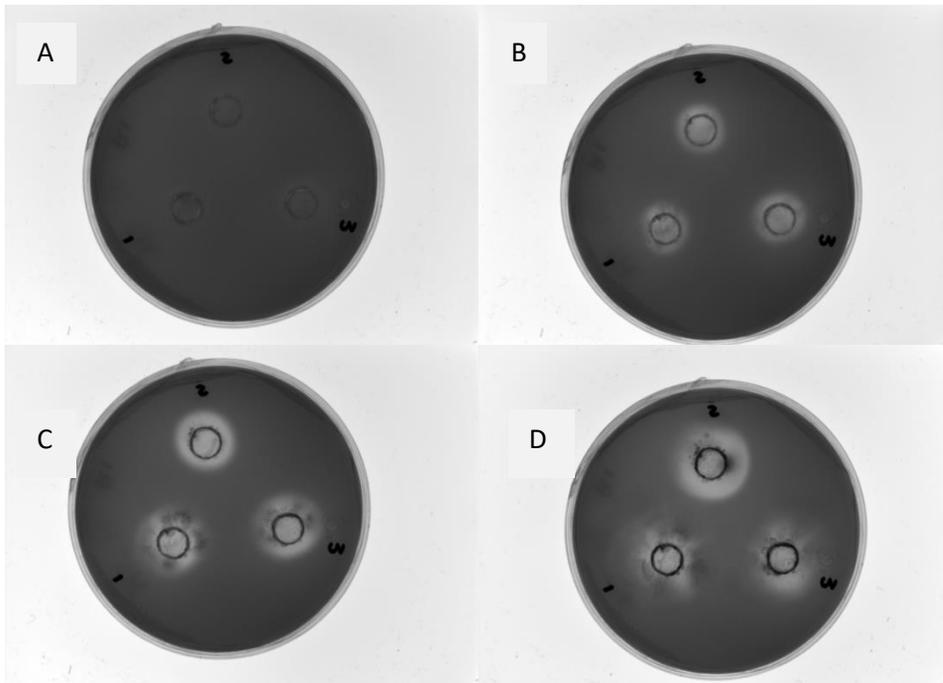
*Hongo 2 con 10 000 UFC. A) Hongo con 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación; C) 72 hr de incubación; D) 120 hr de incubación.



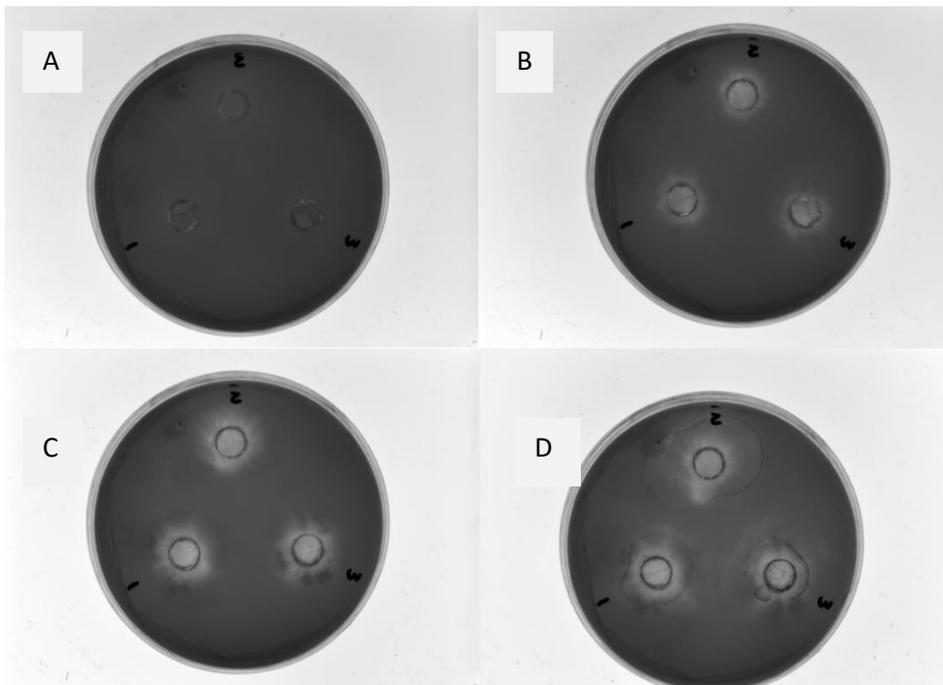
*Hongo 2 con 50 000 UFC. A) Hongo con 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación; C) 72 hr de incubación; D) 120 hr de incubación.



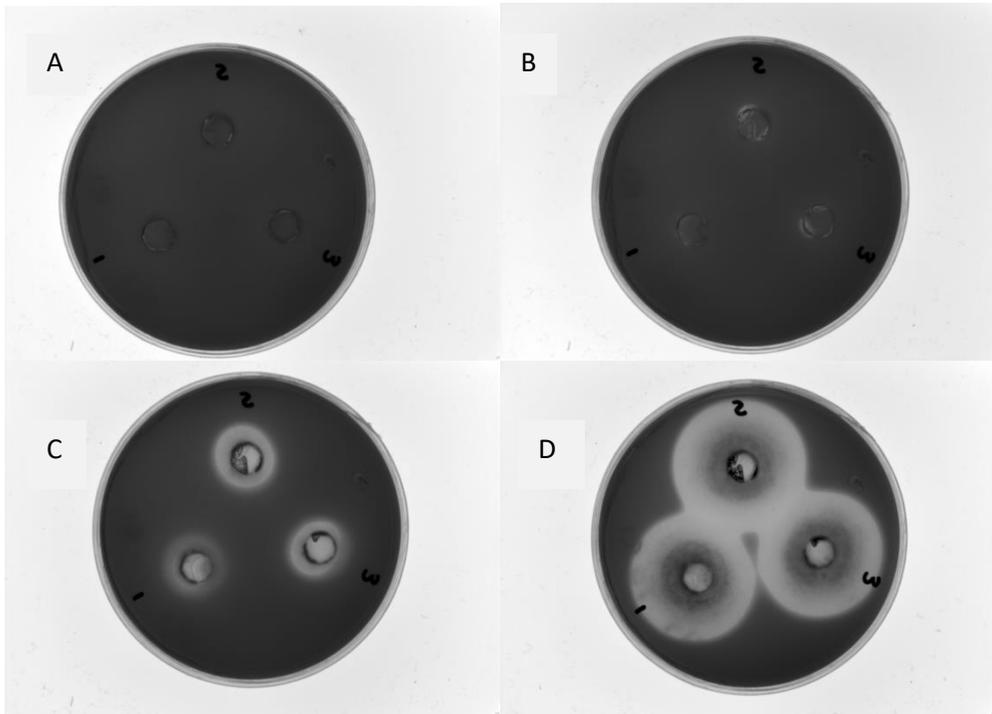
*Hongo 2 con 100 000 UFC. A) Hongo con 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación; C) 72 hr de incubación; D) 120 hr de incubación.



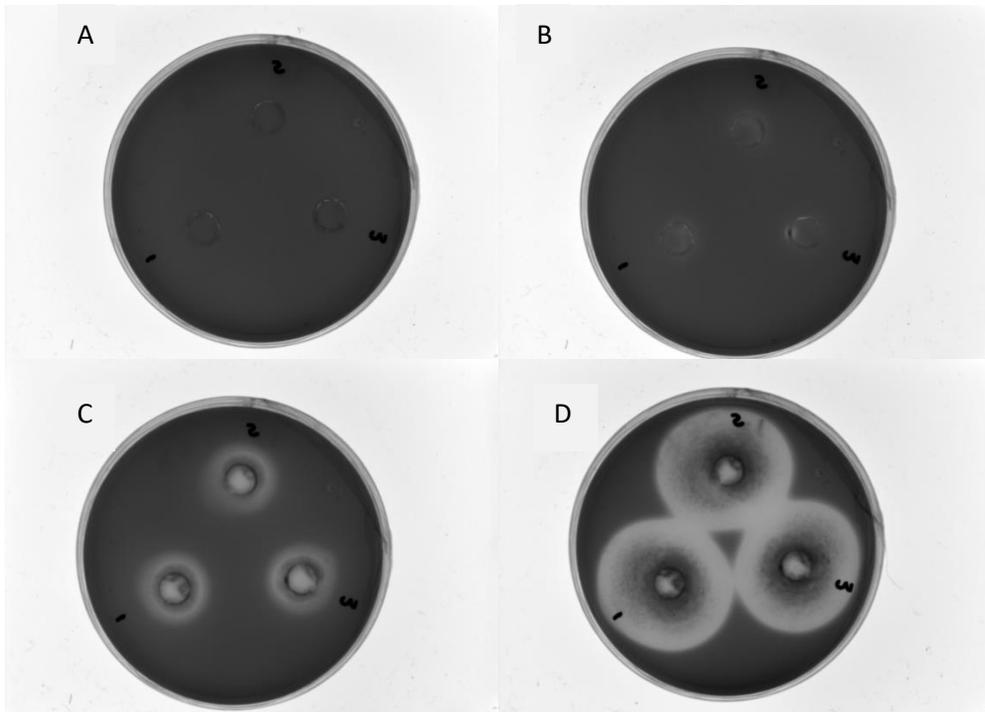
*Hongo 6 con 10 000 UFC. A) Hongo con 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación; C) 72 hr de incubación; D) 120 hr de incubación.



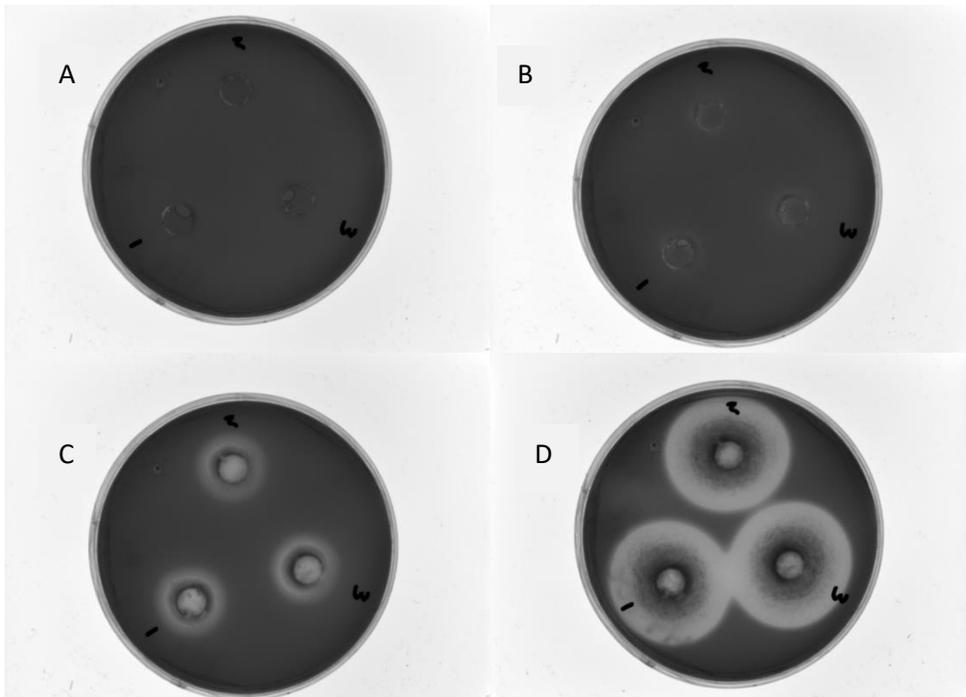
*Hongo 6 con 50 000 UFC. A) Hongo con 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación; C) 72 hr de incubación; D) 120 hr de incubación.



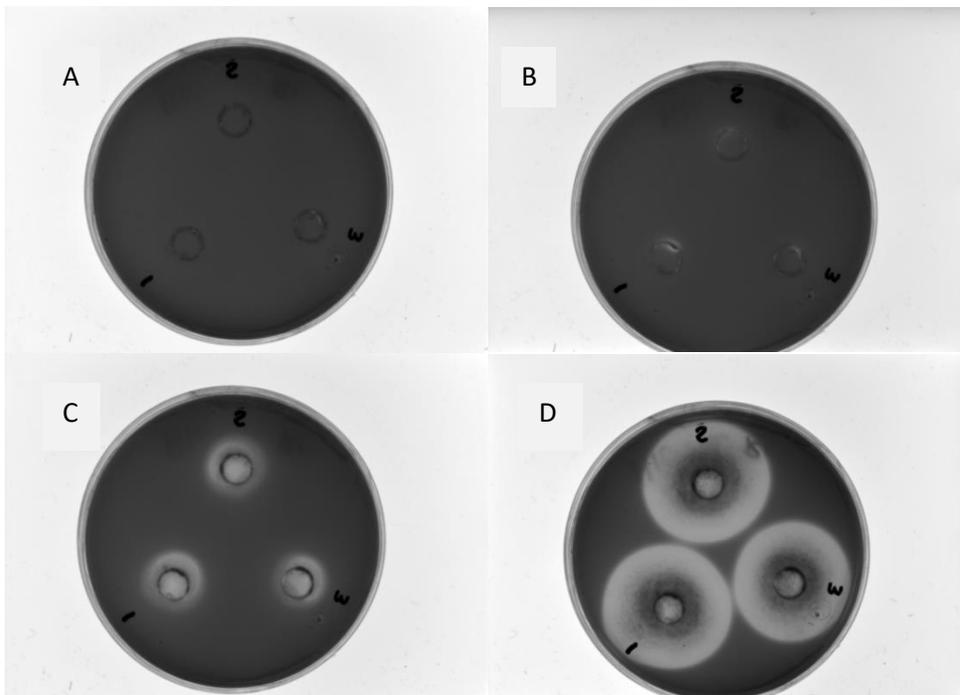
*Hongo 9 con 10 000 UFC. A) Hongo con 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación; C) 72 hr de incubación; D) 120 hr de incubación.



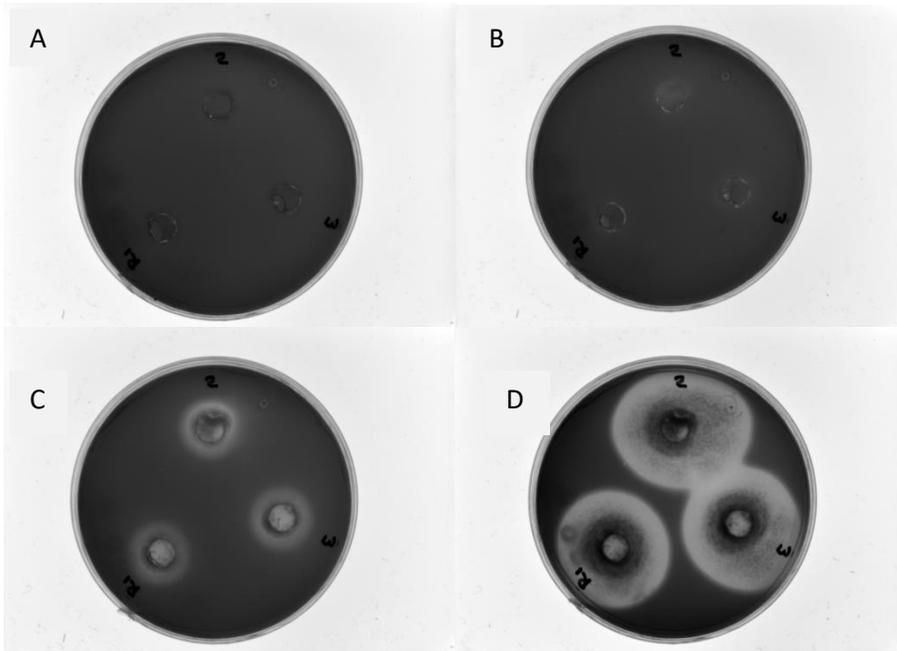
*Hongo 9 con 50 000 UFC. A) Hongo con 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación; C) 72 hr de incubación; D) 120 hr de incubación.



*Hongo 9 con 100 000 UFC. A) Hongo con 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación; C) 72 hr de incubación; D) 120 hr de incubación.



*Hongo 10 con 10 000 UFC. A) Hongo con 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación; C) 72 hr de incubación; D) 120 hr de incubación.



*Hongo 10 con 50 000 UFC. A) Hongo con 24 hr de incubación; B) 48 hr de incubación; C) 72 hr de incubación; D) 120 hr de incubación.