

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Efecto de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo en el Crecimiento y Desarrollo de Plantas de Tomate (*Solanum lycopersicum L.*) Bajo Condiciones de Invernadero

Por:

**JUAN GILBERTO SANTIAGO MARTÍNEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2012

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA**

**DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA**

Efecto de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo en el Crecimiento y Desarrollo de Plantas de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Bajo Condiciones de Invernadero

Por

**JUAN GILBERTO SANTIAGO MARTÍNEZ**

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Aprobada



Dr. Edmundo Rodríguez Campos

Asesor Principal



Dra. Sylvia Yudith Martínez  
Amador



Dra. Erika Vázquez Guzmán

Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera

Coordinador de la División de Agronomía

División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2012

## AGRADECIMIENTOS

**ADios** que ha sido inspiración y consuelo en mi vida, que me ha enseñado a seguir adelante y concluir uno más de mis objetivos.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por permitir mi formación académica, y enseñarme una vez más que la educación al hombre malo lo hace bueno y al bueno mejor.

Al **Dr. Edmundo Rodríguez Campos**, por haberme permitido participar en el proyecto de investigación, de la cual se derivó esta tesis.

A la **Dra. Erika Vázquez Guzmán**, que resolvió cada una de las dudas presentes con respecto a la investigación.

Al **Mc. Abel Salas Partida**, por su amistad y mostrar esa disponibilidad de ayuda a cada momento.

A mis amigas **Tatiana Bustos** y **Mayra Cabañas** que han sido parte muy importante de mi vida, esos momentos no se olvidan gracias por su amistad.

A todas las personas que me han demostrado su **AMISTAD**, detrás de este logro están ustedes, gracias por su apoyo, confianza y cariño.

## DEDICATORIA

**A MIS PADRES: María Martínez Miguel.**

**Francisco Santiago Bautista.**

Por su amor, confianza y apoyo, por darme la oportunidad de superarme en un ámbito profesional, por los esfuerzos realizados para que concluyera mis estudios y por cada uno de sus consejos a lo largo de esta vida.

A todos mis hermanos, pero en especial **a Elena, Regina, Alfonso, Tomas y Francisco**. Con su apoyo incondicional han sido parte de mi formación profesional, por todos esos momentos compartidos en nuestras vidas.

A mis sobrinas **Xóchitl, Gaby, Peque** y **Maleni** por compartir muchas alegrías y estar en unión siempre con la familia.

A mis amigos de la Universidad que siempre han estado en las buenas y en las malas: Eloy, Vicky, Ricardo, Miguel, Juan I, Sala, Toki, Cristino, Rocky, Claudio, Luis R y Oribe.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. OBJETIVOS	3
III. HIPOTESIS	3
IV. REVISION DE LITERATURA	4
Papel del fósforo como nutriente y su importancia	4
Formas de fósforo en el suelo	6
Requerimientos de los cultivos: recomendaciones de aplicación	9
Papel de las bacterias en la solubilización: principales géneros y posibles mecanismos	11
Biofertilizantes	14
El cultivo de tomate	16
V. MATERIALES Y MÉTODOS	18

Antecedentes:	18
Semillero	20
Activación de cepas bacterianas (tratamientos)	21
Trasplante y aplicación de los tratamientos	22
Diseño experimental	24
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	30
VII. CONCLUSIONES	40
VIII. RECOMENDACIONES	40
IX. BIBLIOGRAFIA	41
X. ANEXOS	49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales formas de fosfato inorgánico _____	7
Tabla 2 Tratamientos utilizados en el bioensayo Bibs-10. _____	19
Tabla 3: Tratamientos utilizados en el bioensayo BIBS-11 _____	20
Tabla 4: Diluciones de 10 a 200 ppm. _____	27
Tabla 5: Análisis de varianza y pruebas de rango estudentizado de Tukey, para un cultivo de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> var. Floradade) inoculadas con diferentes BSP. _____	30
Tabla 6: Agrupamiento de Tukey, para índice de deficiencia de fósforo en plantas de tomate. _____	32
Tabla 7 Agrupamiento Tukey para altura de plantas de tomate _____	33
Tabla 8: Agrupamiento Tukey para peso foliar en plantas de tomate _____	34
Tabla 9: Agrupamiento Tukey para peso seco de raíz en plantas de tomate. ____	36
Tabla 10: Agrupamiento Tukey para fósforo foliar gramo por kilogramo en plantas de tomate _____	37
Tabla 11: Agrupamiento Tukey para fósforo foliar mg/planta en plantas de tomate	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Detalles del experimento _____	23
Figura 2 Índice de deficiencia de fósforo en plantas de tomate ( <i>Solanum Lycopersicum L. var. Floradade</i> ) inoculadas con diferentes BSP. _____	31
Figura 3:: Altura en plantas de tomate ( <i>Solanum Lycopersicum L. var. Floradade</i> ) inoculadas con diferentes BSP. _____	32
Figura 4: Peso seco foliar de plantas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum var. Floradade</i> ) inoculadas con diferentes BSP.. _____	33
Figura 5: Peso se raíz en plantas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum var. Floradade</i> ) inoculadas con diferentes BSP.. _____	35
Figura 6: Fósforo foliar g/kg en plantas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum var. Floradade</i> ) inoculadas con diferentes BSP _____	36
Tabla 7 Fósforo foliar mg/planta en plantas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum var. Floradade</i> ) inoculadas con diferentes BSP. _____	37



## RESUMEN

En el laboratorio de Agrobiotecnología se lleva a cabo un proyecto que tiene como objetivo el desarrollo de un biofertilizante con bacterias solubilizadoras de fósforo, desde su aislamiento primario a partir de solanáceas tanto silvestres como cultivadas, la demostración de su actividad tanto *in vitro* como en invernadero, el aislamiento, identificación y purificación de las bacterias hasta la prueba en campo de los formulados bacterianos.

En un trabajo previo a esta tesis se demostró que algunos consorcios bacterianos aplicados a plantas de tomate en invernadero promovían la asimilación de fósforo, sin embargo, se encontró que no todas las bacterias aplicadas en dicho consorcio se establecían en la rizósfera. Este trabajo de tesis está enfocado a la demostración de la actividad solubilizadora en forma individual de las cepas bacterianas utilizadas en el ensayo anterior, que demostraron establecerse en la rizósfera.

Se evaluó la capacidad de 17 cepas bacterianas agrupadas en dos consorcios para promover la asimilación de fósforo. Se hicieron dos bioensayos en las que se evaluaron 19tratamientos y el control absoluto, todos con 10 repeticiones por tratamiento. Se utilizó como sustrato: peatmoss + suelo de Navidad, N.L., [1:1] + roca fosfórica y con una fertilización de 0% de fósforo.

Las plantas que presentaron mejores resultados en cuanto a las variables evaluada: Índice de deficiencia de fósforo, Altura de la planta, Peso seco de raíz, Peso seco foliar, Fósforo foliar g/Kg y Fósforo foliar en miligramos por planta, fueron las que inocularon con las cepas CBLA-208 (*Psuedomona sp*), CBLA-172 (*Psuedomona sp*) y CBLA-88 (*P aeruginosa*).

**Palabras clave:** Biofertilizantes, Cepas, Consorcio, solubilizadora.

## I. INTRODUCCIÓN

El fósforo es un nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas como para microorganismos. Su principal función fisiológica es intervenir en procesos de acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular (Coyne, 2000); sin embargo, el fósforo soluble es un nutriente limitado para producción de biomasa en un ecosistema natural (Hameeda *et al.*, 2006).

El 95% del fósforo es fijado rápidamente por los componentes del suelo (Fernández *et al.*, 2005), por ello la necesidad de aplicar grandes cantidades de fertilizante a los cultivos, que ha traído como consecuencia la acumulación de los fertilizantes fosforados debido a la alta reactividad con los componentes minerales formando sales de Aluminio, Hierro y Calcio (Navarro y Navarro, 2003). Las plantas absorben el fósforo casi exclusivamente en la forma inorgánica ortofosfato, que está en la solución del suelo, sin embargo la mayor parte del fósforo aplicado como fertilizante es fijado a formas insolubles, de esta manera, el P inorgánico disuelto satisface la demanda de los cultivos solo por unas pocas horas durante el período de crecimiento, aún en suelos con un buen abastecimiento de este nutriente (Boschetti *et al.*, 2001).

Los biofertilizantes son insumos biológicos a base de microorganismos que viven en el suelo o en la planta y que cumplen funciones directas o indirectas en la nutrición de esta, bien sea proporcionando, captando o haciendo disponibles elementos esenciales para los cultivos, así como suministrándoles sustancias de crecimiento y de defensa ante condiciones de estrés biótico o abiótico (López, 2010).

El tomate es uno de los cultivos hortícolas más rentables en el mundo (Hilhorst *et al.*, 1998). En México, el tomate es el cultivo hortícola de mayor importancia económica y social, por la superficie sembrada, el volumen en el mercado nacional, y las divisas generadas (Cruz, 2007).

## **II. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de bacterias solubilizadoras de fósforo inoculadas en forma de consorcio y de manera aislada en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar el crecimiento y desarrollo de las plantas usando una valoración en forma cuantitativa y cualitativa.
- Determinar el contenido total de fósforo de las plantas cultivadas.
- Determinar la efectividad de bacterias solubilizadoras de fósforo, utilizando como parámetro las variables evaluadas.

## **III. HIPOTESIS**

Existen diferencias en los efectos producidos por las bacterias solubilizadoras de fósforo en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate cuando actúan en consorcios o de manera aislada.

## IV. REVISION DE LITERATURA

### Papel del fósforo como nutriente y su importancia

El fósforo (P) es uno de los 17 nutrientes considerados esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Marschner, 1995). Es absorbido principalmente durante el crecimiento vegetativo, luego la mayoría del fósforo absorbido es movilizado hacia frutos y semillas durante etapas reproductivas. Su valor medio, expresado en  $P_2O_5$  (óxido fosfórico), puede situarse entre 0.5 y 1% de materia seca (Navarro y Navarro, 2003).

Los síntomas generales de la falta de fósforo están ligados a un desarrollo anormalmente débil del vegetal, tanto en su parte aérea como en su sistema radicular. Ello es consecuencia, tal como sea visto, de que el elemento es un participante básico en casi todos los procesos de crecimiento y síntesis de sus compuestos constituyentes. Las características más específicas cuando existe deficiencia aparecen en las hojas que se hacen más delgadas, erectas, de menor tamaño que las normales y con las nerviaciones poco pronunciadas debido a la alta movilidad del fósforo en la planta (Navarro y Navarro, 2003).

Las cultivos absorben el fósforo como iones de fosfato monoácido y diácido de la solución del suelo (Rossi *et al.*, 2006); donde se encuentra en muy baja concentración, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30  $mg/kg^{-1}$  (Fernández *et al.*, 2005). Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio (Peixet *et al.*, 2001); dependiendo el valor de pH del suelo se determina la disponibilidad de fosfatos asimilables por la planta, en suelos ácidos los fosfatos asimilables se combinan con el hierro y aluminio formando sales y complejos químicos insolubles, mientras que en suelos alcalinos se combina principalmente con

elcalcio y magnesio formando sales insolubles como fosfato tricálcico (Rodríguez, 1999).

La principal función fisiológica del fósforo es intervenir en procesos de acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular (Coyne, 2000). Forma parte de enzimas, ácidos nucleicos, proteínas y está involucrado en prácticamente todos los procesos que a continuación se describen:

#### Fotosíntesis

La fotosíntesis es la reacción química más importante de la naturaleza, esta reacción utiliza energía luminosa, en presencia de clorofila, para combinar el dióxido de carbono y el agua en azúcares simples. En este proceso, la energía solar es capturada en forma de ATP e inmediatamente este compuesto está disponible como fuente de energía para muchas otras reacciones dentro de la planta. Por otro lado, los azúcares formados se usan como bloques para construir compuestos estructurales y de almacenamiento (Mite, 1999).

#### Transferencia genética

El fósforo es un componente vital del ácido desoxirribonucleico (ADN) y del ácido ribonucleico (ARN), que son las sustancias que forman los genes, cromosomas y ribosomas, la información de este elemento es parte esencial de los procesos que transfieren el código genético de una generación a la siguiente, proveyendo el mapa genético para todos los aspectos de crecimiento y reproducción de la planta. Es importante la suficiente acumulación de fósforo en frutos y semillas, donde es esencial para su formación y desarrollo (Mite, 1999).

#### Transporte de nutrientes

El movimiento de nutrientes dentro de la planta depende en mucho del transporte a través de las membranas de las células, proceso que requiere de energía la mayor parte de las veces. De nuevo aquí, el ATP y otros compuestos fosfatados proveen la energía necesaria para este proceso (Mite, 1999).

## Formas de fósforo en el suelo

Diferentemente al nitrógeno, que como ya se ha visto puede incorporarse a los suelos por medio de la fijación bioquímica por microorganismos, el fósforo no tiene tal ayuda microbiana. Este elemento procede solo de la descomposición de roca madre durante el proceso de la meteorización, y representa alrededor del 0.1% de la corteza terrestre. (Navarro y Navarro, 2003). El fósforo en el suelo tiene su origen orgánico e inorgánico, en sus distintas proporciones según el tipo e historia del suelo (Rodríguez, 1999).

### Fósforo orgánico

El fósforo orgánico proviene de restos vegetales y animales que al ser degradados por los microorganismos del suelo liberan compuestos fosfatados, este constituye del 29 al 65% del fósforo presente en la superficie del suelo (Arzuaga *et al.*, 2005). No obstante, el componente orgánico central del ciclo del fósforo es la biomasa microbiana. Estudios realizados por Picone *et al.*, (2002) en una pastura mixta fertilizada con distintas dosis de P, indicaron que el contenido de la biomasa microbiana es de  $29 \text{ mg P/kg}^{-1}$  en los primeros 15 cm de suelo y represento el 5% del P orgánico total. El fósforo orgánico que ha sido identificado específicamente en el suelo se encuentra, sobre todo, bajo tres formas más o menos degradadas: fosfolípidos, ácidos nucleicos y fitina (Navarro y Navarro, 2003).

### Fósforo inorgánico

Son muy numerosos los compuestos inorgánicos que predominan en los suelos. Pero la mayor parte pueden clasificarse en dos grandes grupos: 1) Los que contienen calcio; y 2) Los que contienen hierro y aluminio. Los compuestos que bajo un punto de vista agronómico, tienen mayor importancia son los fosfatos mono y bicálcico porque son fácilmente asimilables por las plantas, mientras que los fosfatos de hierro y aluminio son fosfatos hidroxilados extremadamente insolubles (Navarro y Navarro, 2003).

Tabla 1: Principales formas de fosfato inorgánico

	Denominación	Composición	Característica
	Hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}(\text{OH})_2$	Mayor abundancia
<b>Fosfatos</b>	Fluorapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_2\text{F}_2$	Mayor abundancia
<b>de Calcio</b>	Fosfato tricálcico	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	
	Fosfato bicálcico	$\text{CaHPO}_4$	Mayor solubilidad
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	Mayor solubilidad
<b>Fosfato</b>	Vivianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	
<b>de Hierro</b>	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
<b>Fosfatos de Aluminio</b>	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	

Fuente: Adptado por Tsai y Rossetto, 1992.

Desde el punto de vista edafológico interesa clasificar al fósforo inorgánico de acuerdo a su disponibilidad para las plantas en fósforo soluble, intercambiable e insoluble.

#### Fósforo soluble

Son las formas aprovechables para las plantas en forma inmediata, es decir, son fosfatos en la solución del suelo. Su concentración es muy débil y fluctúa entre 0.2 y 0.5 mg/L, o sea 200 a 400 gr/ha en 30 centímetros de espesor.

En suelos muy ricos la concentración puede llegar hasta 1mg/L para que los cultivos se abastezcan convenientemente, es necesario que ocurra una renovación del fósforo en la solución. El equilibrio entre las distintas formas fosfatadas es lo que asegura la nutrición de los vegetales. Las formas solubles de fósforo en el suelo son los fosfatos diácido ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y monoácido ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). La concentración de los iones fosfatos en solución está relacionada con el pH de la misma. El ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  es favorecido por los pH bajos, mientras que el ion  $\text{HPO}_4^{2-}$  por los pH más altos ([www.edafologia.com.ar](http://www.edafologia.com.ar)).

#### Fósforo intercambiable

Es también llamado fósforo lábil o adsorbido, y su disponibilidad es más lenta que el anterior. La adsorción aniónica en el suelo, es un fenómeno que depende del pH. A pH ácidos aumentan las cargas positivas de los coloides y por ende, aumenta la adsorción. Estos iones forman parte del enjambre de iones que rodean a las partículas coloidales y están en constante movimiento. Representan del 15 al 30% del fósforo inorgánico, lo que significa de 800 a 2500 kg de  $\text{P}_2\text{O}_5/\text{Ha}$ . Este fósforo lábil puede estar adsorbido directamente por los bordes de las arcillas (cuando estas tienen cargas positivas como la caolinita a bajos valores de pH), o por iones que usan al calcio como puente. También puede estar adsorbido por los óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio, que tienen un poder de fijación mucho mayor que el de las arcillas ([www.edafologia.com.ar](http://www.edafologia.com.ar)).

#### Fósforo insoluble

Es aquél que está formando parte de los minerales primarios y secundarios, y constituye la gran reserva de fósforo inorgánico en el suelo. La insolubilización se puede deber a la precipitación como fosfatos cálcicos en medio alcalino, o como fosfatos de hierro y aluminio en medio ácido. Tanto en suelos ácidos como alcalinos, el fósforo tiende a sufrir una cadena de reacciones que producen compuestos fosforados de baja solubilidad. Por lo tanto, durante el largo tiempo que el fósforo permanece en el suelo, las formas menos solubles, y por ende las menos disponibles para la planta, tienden a aumentar. Cuando se agrega fósforo



soluble al suelo, usualmente ocurre una rápida reacción (de unas pocas horas) que remueve el fósforo de la solución (fija el fósforo). Lentas reacciones posteriores continúan gradualmente reduciendo la solubilidad durante meses o años, según la edad de los compuestos fosfatados. El fósforo recientemente fijado puede ser débilmente soluble y de algún valor para las plantas. Con el tiempo, la solubilidad del fósforo fijado tiende a decrecer a niveles extremadamente bajos. Este fenómeno se conoce como envejecimiento del fósforo. (www.edafologia.com.ar).

### **Requerimientos de los cultivos: recomendaciones de aplicación**

Si la fertilidad natural de un suelo fuera capaz de aportar todos los elementos minerales que extrae un cultivo, no sería necesario aplicar fertilizantes. Sin embargo, en la práctica no es así, con el avance de la tecnología, la agricultura se intensificó y muy especialmente en hortalizas. Los fertilizantes fosforados se suministran a los suelos como sales de los ácidos fosfóricos de diverso grado de deshidratación (ácido fosfórico, ácido metafosfórico y ácido pirofosfórico. (Yúfera y Carrasco, 1981).

La cantidad de fósforo y los momentos puntuales de necesidad en este elemento dependen de la especie, de la variedad, del rendimiento potencial y por supuesto, de la calidad de la cosecha. La fertilidad de un suelo en lo que a fósforo se refiere, se define como la capacidad del suelo de suministrar a los cultivos las cantidades que precisa, y en los momentos puntuales en los que es necesaria su absorción. Las características físicas y químicas del suelo determinan la capacidad y ritmo en el que el suelo es capaz de reponer el fósforo que las plantas van tomando de la solución. En este proceso influyen fundamentalmente, la textura, el pH, la caliza activa y la materia orgánica (García-Serrano *et al.*, 2009).

En definitiva, la fertilidad del suelo en fósforo es la cantidad de fósforo asimilable presente y, entendemos por asimilable, la fracción extraíble con ácidos débiles a una concentración definida (García-Serrano *et al.*, 2009).

Arellano-Gil y Gutiérrez-Coronado en 2006, recomiendan  $150 \text{ kg/ha}^{-1}$  en un esquema de fertilización al suelo bajo el método de riego por gravedad; por otro lado, Ramírez y Morales (1989) hacen recomendaciones dependiendo del nivel de fósforo disponible en el suelo. Los niveles de fósforo disponibles los obtienen de un análisis previo al suelo y son los siguientes:

- BAJO: entre 0 y 10 ppm de P
- MEDIO: entre 10 y 19 ppm de P
- ALTO: entre 19 y 30 ppm de P
- MUY ALTO: con más de 30 ppm de P

Dependiendo del nivel en donde se ubique el suelo analizado, las recomendaciones son las siguientes:

Aplicar  $43$  o más  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$  a suelos de categoría BAJA

Aplicar entre  $35$  a  $43 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$  a suelos de categoría MEDIA

Aplicar entre  $18$  y  $35 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$  a suelos de categoría ALTA

Aplicar menos de  $18 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$  a suelos de categoría MUY ALTA.

De esta manera se deben de indicar los siguientes principios básicos a la hora de fertilizar con fósforo (García-Serrano *et al.*, 2009):

- En suelos con contenidos en fósforo, normales o altos, la fertilización debe tener por objetivo mantener la fertilidad del suelo, es decir, realizar un abonado de mantenimiento. El abonado debe coincidir con las extracciones de los cultivos siempre que el pH se aproxime a la neutralidad. Si el pH es muy básico se abonara con cantidades adicionales, mayores cuando mas arcillosa sea la estructura del suelo.
- En suelos pobres en fósforo el abonado debe cubrir las necesidades del cultivo, abonado de mantenimiento y las necesidades para enriquecer el suelo. Se aportaran cantidades mayores cuanto mayor sea el pH del suelo y mayor su contenido en arcilla.
- En suelos ricos y muy ricos en fósforo se deberán reducir las dosis de mantenimiento e incluso suprimirlas, en mayor medida cuando se trate de suelos básicos, con gran contenido en arcilla.

Las aplicaciones de fósforo pueden ser en presembrado o coincidiendo con la siembra. El fósforo se aplica normalmente junto con la primera aportación de nitrógeno y potasio. La fertilización fosfatada será con mayor anticipación cuanto menor sea la solubilidad de la fuente que se emplee.

### **Papel de las bacterias en la solubilización: principales géneros y posibles mecanismos**

Durante los últimos años, el conocimiento sobre los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSP) ha aumentado significativamente. Entre los MSP se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del

inglés“plan growth promotion rhizobacteria”) estas bacterias son de vida libre en el suelo y son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta, también favorecen su crecimiento o desarrollo (Bashan, 1998).

Investigadores han reportado que las BSP son capaces de solubilizar fosfato inorgánico de diferentes compuestos, como son el fosfato bicálcico, fosfato tricálcico y rocas fosfóricas. Con el término rocas fosfóricas se conoce a los minerales que contienen P como es el caso de las apatitas, incluyendo fluorapatita, cloroapatita e hidroxiapatita (Hoffland, 1992; Ivanova *et al*, 2006 y Chen *et al*, 2006).

Existen géneros de bacterias con la capacidad de solubilizar fosfato: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Erwinia* (Rodríguez y Fraga, 1999; Vázquez *et al.*, 2000). Algunos microorganismos solubilizan el fosfato insoluble con procesos como producción de ácidos orgánicos, fosfatasas, quelación y reacciones de intercambio (Draguillo y Merck, 2002; Johnson y Loeppert., 2006; Begonia *et al.*, 2004 y Onthong *et al.*, 2007). Estos procesos ayudan a movilizar los fertilizantes adicionados al suelo (Fankem *et al.*, 2006); y por lo tanto el fósforo solubilizado es fácilmente absorbido por las raíces de las plantas y utilizado para su crecimiento y desarrollo.

Se ha reportado al ácido glucónico como el agente más frecuente de solubilización de fosfato, el cual es producido por *Pseudomonas* sp. (Illmer y Shinner, 1992), *Erwinia herbicola* (Liu *et al.*, 1992), y *Burkholderia cepacia* (Rodríguez y Fraga 1999).

#### Producción de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos actúan sobre compuestos insolubles de fosfato inorgánico como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica. Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el oxálico, cítrico, láctico, y succínico, se producen en el suelo como resultado de la descomposición

de la materia orgánica. La cantidad y tipo ácido depende de los diferentes grupos de microorganismos. Los ácidos orgánicos permiten que haya solubilización debido a que su presencia cambia los valores de pH hasta valores ácidos, en donde el número elevado de protones provoca, por competencia en los sitios de adsorción del fósforo, el cambio de las cargas superficiales de los adsorbentes, dando como resultado la solubilización (Halder y Chakrabartty, 1993).

Se ha investigado que los ácidos orgánicos forman complejos solubles con iones de metales como el calcio (quelatos), aluminio y hierro que están asociados a fósforo insoluble, haciendo que el fósforo quede en forma disponible, reduciendo la adsorción (Rashid *et al.*, 2004).

### Mineralización

La mineralización es la conversión microbiana del P orgánico a  $H_2PO_4$  o  $(PO_4)^{3-}$  ortofosfato, que son formas de fósforo disponibles para las plantas, El P orgánico puede ser mineralizado como subproducto de la mineralización de la materia orgánica del suelo o mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por la demanda de este nutriente (Picone y Zamuner, 2002). Este proceso está mediado por las enzimas fosfatasas que pueden ser sintetizadas por las raíces de las plantas (Ridge y Rovira, 1971), estas pueden ser producidas por algunos hongos y bacterias.

### Fosfatasas

Un mecanismo para la solubilización de fósforo es por medio de enzimas conocidas como fosfatasas, producidas por microorganismos intracelularmente si la disponibilidad de fosfato es baja, liberándolas al suelo luego de su lisis o por las plantas. El término fosfatasas se emplea para designar a un amplio grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico. Dentro del grupo de las monoésterfosfato hidrolasas se encuentran las fosfatasas alcalinas y las fosfatasas ácidas conocidas como fosfomonoesterasa alcalina y fosfomonoesterasa ácida, son enzimas inespecíficas que catalizan la ruptura

hidrolítica del fósforo orgánico del enlace éster (C-O-P), dejando el fósforo inorgánico disponible para que pueda ser asimilado ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) (Begonia *et al.*, 2004).

Los microorganismos productores de estas enzimas son: *Rhizobium sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp* (Onthong *et al.*, 2007).

## **Biofertilizantes**

En la actualidad los sistemas de producción agrícola enfrentan el problema de lograr una producción sostenida sin degradar los recursos naturales. Campos (1993), indica que el suelo ideal (45 % de material mineral, 5 % de materia orgánica, 25 % de aire y 25% de agua), no es común en México y solo existe en el 5 % del total de las áreas cultivadas; normalmente el agricultor tiene suelos con menos del 1 % de materia orgánica y se salinizan cada vez más debido al uso excesivo de fertilizantes inorgánicos. El uso de fertilizantes inorgánicos en la agricultura actual resulta imprescindible para producir en cantidades suficientes los alimentos requeridos por la población; el abuso en la utilización de estos insumos especialmente los nitrogenados, afecta la calidad ambiental y la economía del productor.

Una alternativa diferente es el uso de biofertilizantes. Estos son insumos biológicos a base de microorganismos que viven en el suelo o en la planta y que cumplen funciones directas o indirectas en la nutrición de ésta, bien sea proporcionando captando o haciendo disponible elementos esenciales para los cultivos, así como suministrándole sustancias de crecimiento y de defensa ante condiciones de estrés biótico o abiótico (López, 2010). Estos bioinsumos representan una opción para reducir el uso de fuentes de nitrógeno y fósforo de origen industrial, lo cual es muy importante en el manejo integrado de las hortalizas que se cultivan.

Los biofertilizantes más comercializados en la actualidad, son inocuos para el hombre y el ambiente, y la mayor respuesta agronómica se ha encontrado en suelos de baja fertilidad. Son más económicos y de fácil transportación, en comparación con los fertilizantes de origen químico sintético que utilizan los productores. Existen varias presentaciones para su comercialización. Los más comunes son los que se aplican a la semilla y van impregnados en turba (materia orgánica de líquenes), pero también pueden distribuirse en suelo molido, medios de agar, caldos nutritivos, liofilizados, o en medios de aceite (INIFAP, 2010).

Algunas presentaciones de biofertilizantes comerciales que se utilizan hoy en día:

Fertibiol es un fertilizante líquido con microorganismos solubilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno para la aplicación del suelo y foliar, perteneciente a GREEN SEAL COMPANY, Biotecnología agrícola de Cali Colombia.

#### Beneficios

- Favorece al desarrollo de sustancias promotoras de crecimiento, aumentando la producción
- Fortalece la raíz, mejorando el crecimiento de pelos absorbentes
- Aumenta la fijación biológica de nitrógeno
- Mejora la estructura y la fertilidad de los suelos

Azofer es un biofertilizante mexicano perteneciente a la compañía Biofabrica Siglo XXI, está elaborado a base bacterias fijadoras de nitrógeno que viven sobre las raíces de las plantas y beneficia diversos cultivos de importancia agrícola como: maíz, trigo, sorgo, mijo, arroz, cebada, avena; también en cultivos perennes: café, cítricos o plantaciones establecidas como los viveros. Una de sus principales funciones es su capacidad para producir hormonas de crecimiento vegetal generando un crecimiento importante de la raíz de la planta.

De acuerdo con Okon y Labandera (1994) el estudio de las bacterias asociadas a las plantas es una línea de investigación que avanza rápidamente en países Europeos y Asiáticos; en menor grado en México y otros países Latinoamericanos, donde se han obtenido resultados satisfactorios al inocular diversas especies con, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azobacter*, *Anabaena* entre otras. Se han utilizado en diferentes cultivos anuales y perennes con diferentes sistemas de manejo.

## **El cultivo de tomate**

La familia de las Solanáceas es un grupo muy grande; contiene 96 géneros, con 2 297 especies (D'Arcy, 1991). Entre las especies domesticadas, podemos mencionar plantas alimenticias tan importantes como la papa, (*Solanum tuberosum* L.), el tomate (jitomate) (*Lycopersicum esculentum* L.), el tomate verde (*Physalis* L.) El tomate y la papa se ubican entre los cultivos más importantes para la alimentación humana, tanto en América como en Europa. A escala mundial ambos cultivos sobresalen al contribuir el 47% de la producción de hortalizas, seguidas por la col, la sandía y la cebolla. En el comercio internacional de hortalizas el 70% se encuentra centrado en siete productos: papa, tomate, cebolla, sandia, pepino, lechuga y melón (SIAP, 2010).

El tomate es uno de los cultivos hortícolas más redituables en el mundo (Hilhorst *et al.*, 1998). En México, el tomate es el cultivo hortícola de mayor importancia económica y social, por la superficie sembrada, el volumen en el mercado nacional, y las divisas generadas. Su popularidad se debe al aceptable sabor y disponibilidad del fruto en una amplia gama de ambientes, así como a su relativa facilidad para ser cultivado (Cruz, 2007). Además su cultivo tiene las siguientes ventajas: genera empleo, debido a que requiere mucha mano de obra desde la siembra hasta el empaque; estimula el empleo urbano proporcionando



oportunidades de negocios en aspectos como manufactura, maquinaria y equipo; se necesita semilla de calidad; su exportación va en aumento, lo mismo que los precios pagados a los productores, generando importantes cantidades de divisas; mejora la nutrición de los consumidores; es muy versátil en su uso porque se puede consumir en fresco, cocinado, frito y procesado industrialmente en conservas, salsas, jugos y en polvo (Cruz, 2007).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. El trabajo se realizó en laboratorio y en invernadero. Los trabajos de laboratorio se realizaron en el laboratorio de Agrobiotecnología perteneciente al Departamento de Ciencias Básicas y se utilizó el invernadero de alta tecnología del Departamento Forestal. El invernadero está orientado de Norte-Sur, la temperatura que controla es de 22°C por el día y por la noche es de 18°C, el tipo de material es de policarbonato doble, tiene una capa con filtro para rayos UV con un grosor de 1.6cm, y cuenta con sistema de extracción, 6 ventiladores, sistema de calefacción FANGETT que consiste en 2 tubos de polietileno que distribuyen el aire caliente en invierno.

### **Antecedentes:**

- Anteriormente a este trabajo las bacterias fueron aisladas de la raíz de solanáceas (*Nicotiana glauca* y de *Solanum tuberosum*) colectadas en los municipios de Saltillo y Galeana, N.L. respectivamente.
- Para el aislamiento primario de bacterias solubilizadoras, el extracto de la raíz de estas solanáceas se inoculó en plántulas de tomate, las cuales se hicieron crecer en invernadero.
- Posteriormente se aislaron las bacterias que se establecieron en las raíces de dichas plántulas, de estos ensayos se seleccionaron 228 cepas bacterianas a las que se les asignaron claves CBNG y CBLA dependiendo de su origen.
- Para la selección de las bacterias se utilizó un medio selectivo que contenía fosfato tricálcico como única fuente de fósforo. Se seleccionaron solo aquellas que formaban un halo de solubilización en dicho medio.

- Las bacterias solubilizadoras aisladas de una misma fuente se juntaron en consorcios y se volvieron a aplicar en inóculo enriquecido, a una concentración de  $2 \times 10^9$  UFC/mL de cada una de las bacterias del consorcio, en este punto se probaron 69 cepas en 24 consorcios.
- Se hizo un nuevo aislamiento de las bacterias partir de la rizófora de las plantas que mostraron mayor captación de fósforo en ensayos en el invernadero. Solo aquellas cepas de BSF que se re aislaron se seleccionaron para probarlas individualmente en este trabajo (17 cepas).

Tabla 2 Tratamientos utilizados en el bioensayo Bibs-10.

TRATAMIENTOS	CEPA	IDENTIFICACION
T <sub>1</sub>	CBLA 159	<i>Pseudomonasp</i>
T <sub>2</sub>	CBLA 86	Sin identificar
T <sub>3</sub>	CBLA 88	<i>P.aeruginosa</i>
T <sub>4</sub>	CBLA 208	<i>Pseudomona sp</i>
T <sub>5</sub>	CBLA 177	<i>Pseudomonas migulae</i>
T <sub>6</sub>	CBLA 117	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
T <sub>7</sub>	CBLA 91	Sin identificar
T <sub>8</sub>	CBLA 172	<i>Pseudomonas sp.</i>
T <sub>9</sub>	T1-T8	Consorcio
<b>Control</b>	-	-

La fertilización para todos los tratamientos consistió en Steiner 0% fósforo

\* SUSTRATO 1: Peatmoss + suelo de Navidad, N.L. [1:1] + Roca Fosfórica 1g/L de la mezcla

Tabla 3: Tratamientos utilizados en el bioensayo BIBS-11

TRATAMIENTOS	CEPA	IDENTIFICACION
T <sub>1</sub>	CBLA 160	<i>Pseudomona sp.</i>
T <sub>2</sub>	CBLA 216	Sin identificar
T <sub>3</sub>	CBLA 84	Sin identificar
T <sub>4</sub>	CBLA 68	<i>Enterobacter cloacae</i>
T <sub>5</sub>	CBNG 14	<i>Acinetobacter sp</i>
T <sub>6</sub>	CBLA 108	Sin identificar
T <sub>7</sub>	CBLA 122	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
T <sub>8</sub>	CBLA 215	Sin identificar
T <sub>9</sub>	CBLA 104	Sin identificar
T <sub>10</sub>	T1-T9	Consortio
<b>Control</b>	-	-

La fertilización para todos los tratamientos consistió en Steiner 0% fósforo

SUSTRATO 1: Peatmoss + suelo de Navidad, N.L. [1:1] + Roca Fosfórica 1g/L de la mezcla.

Se realizó la siembra de semilleros en fechas diferentes para cada bioensayo, para el BIBS-10 fue el 21 de diciembre de 2011 y para el BIBS-11 fue 18 de marzo de 2012.

### Semillero

Se utilizaron semillas de tomate de la variedad *Floradade*, estas se pusieron a germinar en charolas de poliestireno de 200 cavidades, con dimensiones de 60 por 34 cm. Se utilizó como sustrato peat moss más perlita en una proporción de 70:30. Por cada cavidad se introdujeron 3 semillas con el fin de asegurar la germinación.

Para las plántulas los riegos se aplicaron diariamente por la mañana con la solución nutritiva Steiner (*Steiner, 1968*) al 30%, complementando la nutrición con aplicación foliar de fertidrip 20-20-20 cada dos días. Se programo el riego de este modo para evitar que la plántula entrara en una marchitez que pudiera afectar su desarrollo.

## **Activación de cepas bacterianas (tratamientos)**

En el laboratorio aproximadamente con una semana de anticipación al trasplante se activaron las cepas de bacterias que se utilizaron en los tratamientos, dichas cepas fueron previamente aisladas y evaluadas. Estas se encontraban conservadas en congelación a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  con glicerol al 20%. Se utilizaron 17 cepas de bacterianas en los bioensayos y para los consorcios se mezclaron las cepas correspondientes a cada bioensayo (ver tablas 2 y 3).

Las bacterias provenientes de criotubo se sembraron en placas de medio nutritivo MA con la siguiente composición: 0.4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.1g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 g NaCl; 0.02 g  $\text{CaCl}_2$ ; 0.02 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2mg  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 5g Ácido málico; 2g extracto de levadura; 15g agar bacteriológico; 4.5g KOH y 1000mL de agua destilada. Posteriormente se sometieron a incubación a  $30^{\circ}\text{C}$  por dos días.

Una vez desarrollado el crecimiento bacteriano se seleccionó una colonia, se describió la morfología y se revisó que concordara con la información reportada para la cepa correspondiente. Después se inocularon en tubos con 5 mL de medio líquido MA y se incubaron en un agitador/incubador ThermoScientific\* MaxQ 5000 a 200rpm, a  $30^{\circ}\text{C}$  por un día. Posteriormente en matraces con 50 mL del medio líquido MA, se inocularon 2 mL del medio de cultivo extraído del tubo inoculado con anterioridad. Se incubaron en las mismas condiciones que los tubos por un día.

Una vez crecidas las cepas bacterianas, se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos en una centrífuga ThermoScientific SL 40R. Se lavaron dos veces utilizando agua destilada estéril. Se ajustó el volumen final con agua destilada estéril hasta una densidad óptica de 0.6 ( $5.9 \times 10^{10}$  UFC/mL), de cada solución se tomaron 25 mL y se aforaron a 500 mL con agua destilada estéril para formar cada uno de los tratamientos (para inocular  $3 \times 10^9$  UFC/mL de cada cepa). En el caso del consorcio se formó mezclando 25 mL de cada una de las cepas utilizadas en

cada bioensayo y aforando a 500 mL con agua destilada estéril. Las soluciones se conservaron en frascos Nalgene a una temperatura de 4°C. Los tratamientos se mantuvieron 2 días en espera antes del trasplante.

### **Trasplante y aplicación de los tratamientos**

En un bioensayo se evaluaron 9 tratamientos y en otro 10, ambos con un control absoluto. En cada tratamiento se utilizaron 10 macetas de 1L de volumen, cada maceta se consideró como una repetición, por lo tanto en los bioensayos se utilizaron 210 macetas.

Para el Bioensayo BIBS-10 el trasplante se realizó el 26 de enero de 2012 con duración hasta el 27 de febrero de 2012, Mientras que el BIBS 11 se trasplanta el 20 de abril con duración hasta el 18 de mayo de 2012. Se utilizaron bolsas de polietileno negro de 1L. Días antes se hicieron dos riegos pesados al sustrato (ver tablas 2 y 3) con el fin de tener una buena humedad al trasplante y se prepararon las etiquetas de acuerdo al número de bioensayo y repetición. Las plántulas que se trasplantaron tenían una altura entre 15 a 18cm y de tres a cuatro hojas verdaderas.

Para la aplicación de los tratamientos se extrajeron las plántulas de la charola de germinación sin dañar el cepellón y se llevaron a vasos de plástico de 500 mL, en donde se sumergió el cepellón de las de las plántulas en suspensión bacteriana, de acuerdo a los tratamientos propuestos, durante 30 minutos. Mientras transcurría el tiempo se trasplantaron las repeticiones del control ya que estas no utilizaron ninguna cepa bacteriana. Concluido el tiempo de inmersión en la suspensión de los tratamientos, se realizó el trasplante de estos.

Cada bioensayo duró aproximadamente 1 mes después del trasplante llevando a cabo las siguientes labores culturales.

Para cada ensayo se programo el riego con la solución nutritiva Steiner 0% fósforo cada dos días, esto se hizo de forma manual, hasta el día del levantamiento del experimento.

### *Deshierbe*

Consistió en eliminar las malas hierbas tratando de no arrancar la plántula o cultivo. Esta actividad es benéfica en el desarrollo del tomate y evita competencia por espacio o nutrientes.

### *Control fitosanitario*

Hubo plagas que se manifestaron en el cultivo antes y después del trasplante, entre las más comunes se puede mencionar a la paratricia (*Bactericera cockerelli*) y la araña roja (*Tetranychus urticae*), las cuales fueron controladas con Imidacloprid, un insecticida neuractivo, considerado moderadamente toxico por Organización Mundial de la Salud. También se utilizarón bioplaguicidas a base de extractos de *Melia azederach* para controlar dichas plagas.



Figura 1. Detalles del experimento. A) Raíz desarrollada lista para trasplante B) Sumergido de cepellón en los tratamientos C) Vista general de bioensayos.

## **Diseño experimental**

La distribución de los tratamientos en el área experimental fue llevada a cabo mediante un diseño completamente al azar, realizando un sorteo para el etiquetado de las macetas, tomando en cuenta los tratamientos y repeticiones de cada bioensayo, la unidad experimental fue de una planta por cada tratamiento. Las variables cuantificadas al final del bioensayo fueron índice de deficiencia de fósforo, altura de la planta, peso seco foliar, peso seco de raíz, fósforo foliar gramo por kilogramo, fósforo foliar miligramo por planta. Para hacer comparables los experimentos se normalizaron los datos de cada variable de la siguiente manera:

- Se obtuvo una media de los controles para los dos bioensayos, media de índice de deficiencia de fósforo, altura de la planta, peso seco foliar, peso seco de raíz, fósforo foliar gramo por kilogramo, fósforo foliar miligramo por planta.
- Cada media correspondiente a su variable, se multiplica con el resultado real obtenido de cada repetición, esto se hizo para cada bioensayo ya que en ambos obtuvieron datos diferentes.
- Después se dividió entre promedio real del control de cada variable, esto se hizo para cada bioensayo de acuerdo a su promedio real obtenido.

A los resultados obtenidos se le realizó un análisis de varianza y pruebas del rango estudentizado de Tukey (comparación de medias) para variables del BIBS-10 y BIBS-11 con el software SAS (Sistema de Análisis Estadístico).

## **Índice de deficiencia de fósforo**

Se determinó el índice de deficiencia en la absorción de fósforo con una escala de **0** a **5**, esto se llevó a cabo con una valoración por observación de acuerdo con el siguiente criterio:

- 0: Hojas bien desarrolladas.
- 1: Hojas bien desarrolladas con ligera coloración morada.



- 2: Hojas bien desarrolladas con áreas moradas.
- 3: Hojas bien desarrolladas completamente moradas.
- 4: Hojas poco desarrolladas con áreas moradas.
- 5: Hojas poco desarrolladas completamente moradas.

A manera de referencia para esta variable, se realizaron fotografías comparativas entre tratamientos y controles, tanto del haz como del envés de la hoja, seleccionando al azar una planta por tratamiento.

#### *Altura de plantas*

Se realizó la medición de altura de las plantas en cm, anotando su valor en el formato correspondiente. Posteriormente se tomaron fotografías comparativas entre tratamientos y controles utilizando una escala métrica como referencia.

#### *Peso seco de raíz*

Se desprendió la parte aérea de la parte radicular de la planta, mediante un corte en la base. Se separó de manera cuidadosa la raíz del sustrato contenido en las bolsas; posteriormente se lavó la zona radicular hasta obtener una raíz con la menor cantidad de residuos de sustrato. La raíz obtenida de cada planta se depositó en bolsas de papel destreza previamente etiquetadas; posteriormente se trasladaron al laboratorio y se secaron en una estufa a 80° C por 48 h. Ya secas las muestras se pesaron en una balanza analítica A&D HR120 con resolución de 0.0001g.

#### *Peso seco foliar.*

Se desprendió la parte aérea de la parte radicular de la planta, mediante un corte en la base; se fraccionó la parte foliar de la planta y se introdujo en bolsas de papel destreza previamente etiquetadas; posteriormente se trasladaron al laboratorio y se secaron en una estufa a 80° C por 48 h. Ya secas las muestras se pesaron en una balanza analítica A&D HR120 con resolución de 0.0001g.

### *Determinación del fósforo*

La determinación de fósforo disuelto consiste en la detección del ion ortofosfato en la solución por un método cuantitativo. En este caso se utilizó el método de ANSA (Jones and Mills, 1991) recomendado para determinar el contenido de fósforo foliar por el departamento de horticultura de la UAAAN. Éste utiliza el principio de la formación del complejo fosfomolibdico y la posterior formación de un color azul al reaccionar este complejo con el ácido aminonaftilsulfónico (ANSA) en donde la intensidad del color es proporcional al contenido de fósforo en la muestra.

Preparación de muestras empleadas en la determinación de fósforo foliar:

Se seleccionan tres repeticiones al azar del mismo tratamiento o control para constituir una muestra; de cada control y tratamiento se utilizaron 9 repeticiones por la tanto, se obtuvieron 3 muestras por cada tratamiento y/o control. Una vez seleccionadas se molieron en un mortero. Ya molidas las muestras se colocaron en un tubo de plástico de 15 mL con tapa, previamente etiquetado de acuerdo al bioensayo y la repetición correspondiente.

### Extracción

Se pesaron 500 mg de cada muestra y se colocaron en un crisol de porcelana, la muestra se quemó con un mechero y posteriormente se calcinó en una mufla a una temperatura de 500<sup>0</sup>C.

Una vez calcinadas las muestras, a cada crisol se le agregaron 10 mL de agua regia y se agitó. Se dejó reposar la solución por 5 minutos para permitir que las cenizas se asentaran.

Durante el reposo se preparo la curva patrón a utilizar:

### Preparación de la curva patrón.

Para la cuantificación de fósforo en las muestras se utilizó una curva patrón en cada experimento realizado, las soluciones utilizadas eran de fosfato de potasio monobásico con concentración de fósforo conocida, para esto se preparó una solución madre de fosfato de potasio monobásico que contenía 500 ppm de fósforo que se preparó con 0.2196 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 100 mL de agua destilada. Con esta solución madre se prepararon diluciones desde 10 a 200 ppm siguiendo las indicaciones (ver tabla 4).

Tabla 4: Diluciones de 10 a 200 ppm.

DILUCIÓN	mL. de la solución Stock	Aforar a:
200 ppm	20 mL	50 mL
180 ppm	18 mL	50 mL
120 ppm	12 mL	50 mL
100 ppm	10 mL	50 mL
80 ppm	8 mL	50 mL
60 ppm	6 mL	50 mL
40 ppm	4 mL	50 mL
20 ppm	2 mL	50 mL
10 ppm	1 mL	50 mL

Valores determinados empleando la siguiente ecuación

$$C1V1 = C2V2$$

### Análisis de las muestras.

Se tomaron 100µl de las muestras a estudiar y 500µl de cada una de las soluciones de la curva patrón. Para compensar las muestras a 500µl se les agregó 400µl de agua ultrapura. Posteriormente se les agregó 2.5 mL de molibdato de amonio y 1 mL de ANSA a todos, a la solución resultante se agitó y se dejó

reposar por 20 min. Por último se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 640 nm.

Análisis de resultados.

A partir de los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras de la curva patrón se realizó una gráfica con la concentración en el eje de las X y se obtuvo la ecuación de la recta  $y=mx+b$ . Donde se debe despejar la x que corresponde a las ppm de fósforo, empleando los datos obtenidos a partir de la ecuación de la recta ( $y = \text{Absorbancia}$  de cada una de las muestras analizadas). El resultado que se obtiene se refiere a las ppm de fósforo en solución.

*Fósforo foliar g/kg peso seco*

Para calcular esta variable se utilizó el programa Excel 2010, donde se consideraron el tamaño de la muestra (0.5 g, 500 mg) y el volumen en la que se disolvió (10 mL, .01 L):

$$g \text{ Pi} \cdot Kg^{-1} = mg \text{ Pi} \cdot g^{-1} = \frac{(ppm)(0.01 L)}{0.5 g}$$

Ejemplo:

$$107 \text{ ppm: } g \text{ Pi} \cdot Kg^{-1} = \frac{107 \text{ ppm} \times 0.01 L}{0.5 g} = 2.14$$

Esta ecuación se utilizó para todas las muestras, solo se sustituyó el valor de las ppm de cada repetición.

*Fósforo foliar mg/planta*

Del resultado obtenido en fósforo foliar mg por gramo se multiplicó con el resultado de cada repetición de la variable peso seco foliar, para así obtener el resultado final. Por ejemplo, supongamos que tenemos un peso de 2.12 g/Planta:

$$2.14 \text{ mg Pi} \cdot \text{g}^{-1} \times 2.12 \text{ g} = 4.53 \text{ mg Pi} \cdot \text{planta}$$

## VI. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del análisis de varianza y comparación de medias (Tukey) para las variables evaluadas: índice de deficiencia de fósforo, peso seco de raíz, altura de la planta, peso seco foliar, fósforo foliar gramo por kilogramo, fósforo foliar miligramo por planta, señalan que hay diferencias altamente significativas en todos los casos (Tabla 5).

Tabla 5: Análisis de varianza y pruebas de rango estudentizado de Tukey, para un cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Floradade) inoculadas con diferentes BSP.

FV	GL	IDF	PSR	ALT	PSF	FFgKgPS	FFmgP
TRAT	19	4.1089**	0.3335**	33.4453**	2.1796**	0.6769**	12.0480**
ERROR		0.9782	0.0258	9.5369	0.3502	0.0275	0.1735
CV		43.4785	22.6445	9.4839	22.1893	8.0594	7.7447
Media		2.274	0.710	32.562	2.666	2.059	5.378
Máximo		3.332	1.308	37.547	3.693	2.837	9.936
Mínimo		1.293	0.442	29.314	1.961	1.334	2.937

F. V. (Fuentes de Variación), G. L. (Grados de Libertad), IDF (Índice de deficiencia de fósforo 0-5), PSR (Peso Seco de Raíz en g.),

AP (Altura de Planta en cm. ), PSA (Peso Seco de la parte aérea en g), FFKgPS(Fósforo Foliar en Kg/Peso Seco),FFMgP (Fósforo Foliar en Mg/Planta)

C. V. (Coeficiente de Variación), Máx. (Máximo), Prom. (Promedio), Mín.(Mínimo), \* Significativo ( $P \alpha \leq 0.05$ )

\*\* Altamente Significativo ( $P \alpha \leq 0.01$ ).

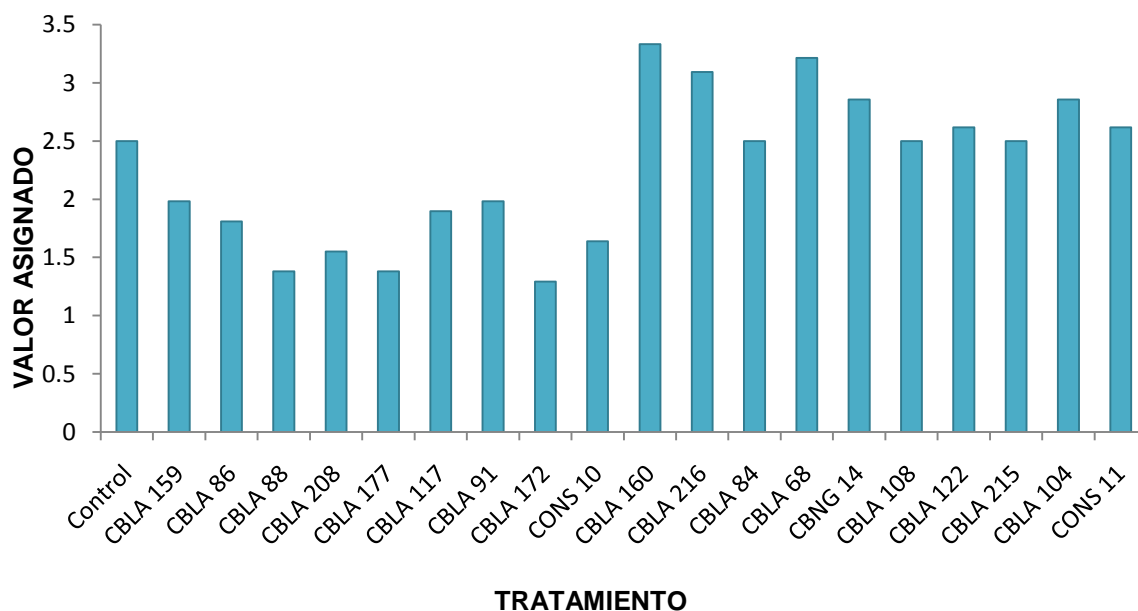


Figura 2: Índice de deficiencia de fósforo en plantas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L. var. Floradade) inoculadas con diferentes BSP.

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos para la variable índice de deficiencia de fósforo, como se puede observar las plantas que presentaron menor índice de deficiencia de fósforo con respecto al control, fueron las que se inocularon con las cepas CBLA-172, CBLA-177 y CBLA-88, sin embargo éstas no fueron significativamente diferentes al control de acuerdo a la comparación de medias de Tukey (tabla6).

Estas plantas presentaron síntomas leves de deficiencia, es decir hojas bien desarrolladas con ligeras áreas moradas, lo que indica que estaban en las fases iniciales de deficiencia, esto demuestra que las cepas inoculadas con mejores resultados utilizaron mecanismos para promover la asimilación de fósforo lo que tuvo como consecuencia una deficiencia mucho menor a la reportada por Epstein and Bloom (2004) donde mencionan que los síntomas de deficiencia se presentan cuando hay plantas enanas, hojas y tallos de color purpura, crecimiento muy lento y plantas avejentadas.

Tabla 6: Agrupamiento de Tukey, para índice de deficiencia de fósforo en plantas de tomate.

Agrupamiento Tukey	Tratamiento
A	CBLA-160
AB	CBLA-68, CBLA-216
ABCD	CBLA- 104, CBNG-14, CBLA-122, CONS 11, CONTROL, CBLA-108, CBLA-84, CBLA-215, CBLA-91,CBLA-159, CBLA-117, CBLA-86
BCD	CONS-10, CBLA 208
D	CBLA-177, CBLA -88, CBLA 172

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

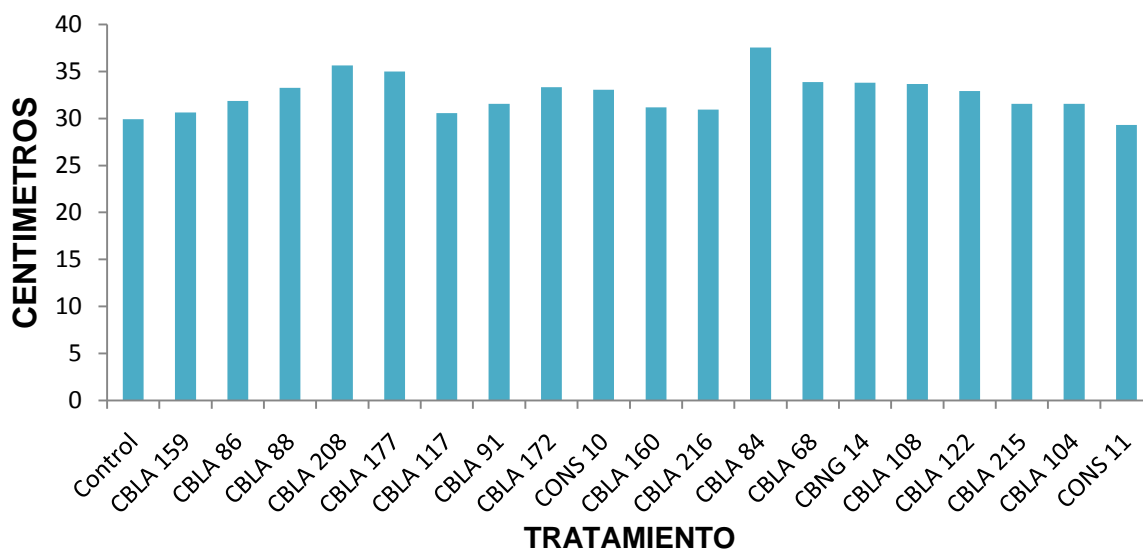


Figura 3: Altura en plantas de tomate (*Solanum Lycopersicum L. var. Floradade*) inoculadas con diferentes BSP.

En la Figura 3 se esquematiza el comportamiento de los resultados, en cuanto a la variable altura de la planta. Las plantas que presentaron mayor altura con respecto al control, fueron las inoculadas con las cepas CBLA 84 superándolo con un 25% y CBLA 208 superándolo con 19%, estos dos resultados se mostraron estadísticamente significativos de acuerdo a la comparación de medias de Tukey (tabla 7)

Estos resultados son similares a lo mencionado por Mahalakshmi (2009) donde dice que las bacterias que se encuentran en contacto con las plantas



pueden ejercer una gama de actividades que individualmente o en combinación pueden ayudar a la promoción del crecimiento.

Tabla 7 Agrupamiento Tukey para altura de plantas de tomate

Agrupamiento Tukey	Tratamiento
A	CBLA-84
AB	CBLA-208,
ABC	CBLA-177
ABCD	CBLA-68, CBNG-14, CBLA-108, CBLA-172, CBLA-88, CONS-10, CBLA-122
BCD	CBLA-86, CBLA-91, CBLA-104, CBLA-215, CBLA-160, CBLA-26, CBLA-159, CBLA-117
CD	CONTROL, CONS-11

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

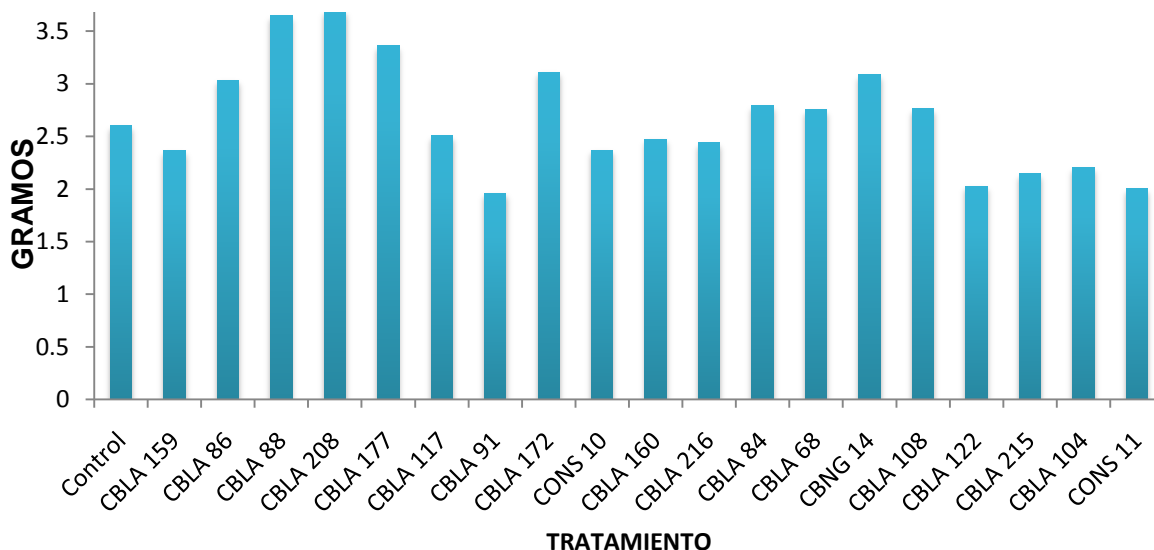


Figura 4: Peso seco foliar de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Floradade) inoculadas con diferentes BSP.

En la gráfica 4 se pueden observar los resultados obtenidos en cuanto la variable peso seco de la parte aérea. La planta que presentó mayor producción de biomasa con respecto al control, fue la inoculada con la cepa CBLA-208 superándolo con un 41% y a su vez mostrando una significancia estadística de acuerdo con la comparación de medias de Tukey (tabla 8). Otras cepas que también obtuvieron buenos resultados fueron las CBLA-88 y CBLA-177 sin embargo no tuvieron significancia estadística.

La buena producción masa aérea en las plantas pudo ser producto de una buena asimilación de fósforo lo que conllevó a producir bioestimuladores u hormonas que beneficiaron a esta.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Dashti *et al* (1997) que al inocular cepas de bacterianas en el cultivo de (*Glicine max*), encontró un mayor incremento en el número de hojas y área foliar.

Tabla 8: Agrupamiento Tukey para peso foliar en plantas de tomate.

<b>Agrupamiento Tukey</b>	<b>Tratamiento</b>
A	CBLA-208
AB	CBLA-88
ABC	CBLA-177
ABCD	CBLA-172
BCD	CBNG-14, CBLA-86, CBLA-84, CBLA-108, CBLA-68, CONTROL, CBLA-117, CBLA-160
CD	
DE	CBLA-216, CONS-10, CBLA-159 CBLA-104, CBLA-215, CBLA-122, CONS-11, CBLA-91

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

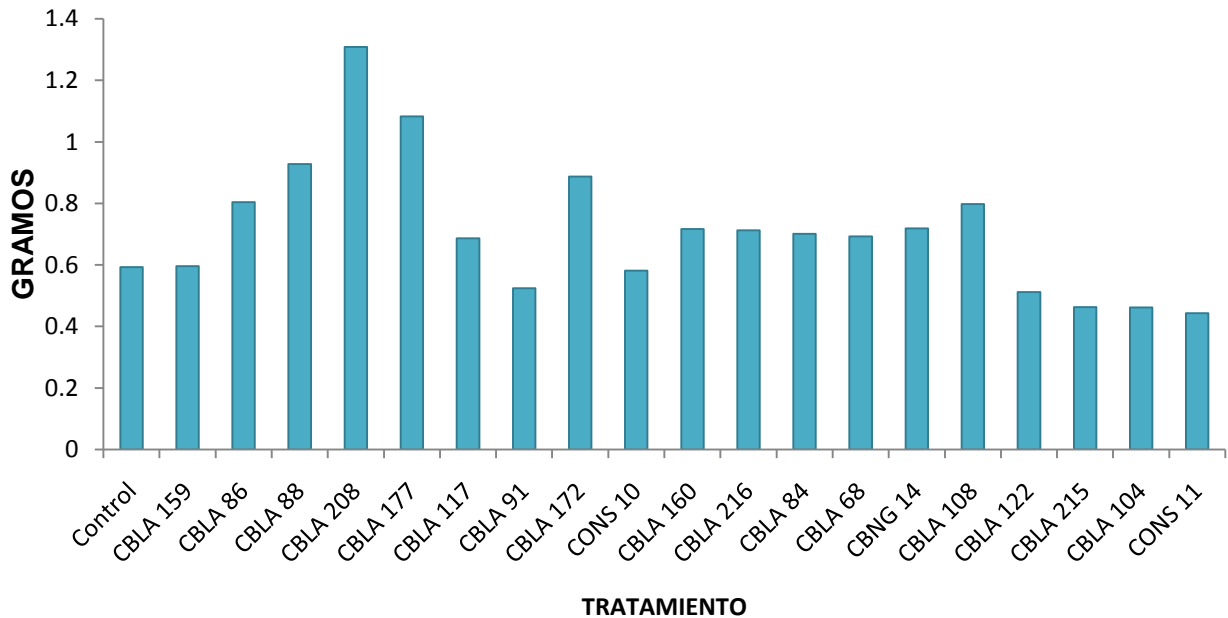


Figura 5: Peso se raíz en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Floradade) inoculadas con diferentes BSP.

La Figura 5 representa los resultados obtenidos en cuanto a la variable peso seco de raíz. Las plantas que presentan los mejores resultados con respecto al control, son las inoculadas con las cepas CBLA-208 superándolo con un 120%, seguida de CBLA-177 superándolo con 82% y CBLA-88 superándolo con 56%, estas cepas mostraron significancia estadística con respecto al control, de acuerdo con la comparación de medias de Tukey (tabla 9). Dicho resultado pudo ser causa de una producción de estimuladores naturales que ayudaron a un desarrollo efectivo de la raíz, así trayendo como beneficio mayor asimilación de nutrientes.

Estos resultados coinciden con lo señalado por Caballero-Mellado, (2006) donde menciona que las Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal ayudan a la síntesis de fitohormonas como auxinas, particularmente la liberación de ácido indol acético que promueve el crecimiento de las raíces y la proliferación de pelos radicales.

Tabla 9: Agrupamiento Tukey para peso seco de raíz en plantas de tomate.

Agrupamiento Tukey	Tratamiento
A	CBLA-208
AB	CBLA-177
BC	CBLA-88
BCD	CBLA-172
BCDE	CBLA-86, CBLA-108
CDEF	CBNG-14, CBLA-160, CBLA 216, CBLA-84, CBLA 68, CBLA-117
DEF	CBLA 159, CONTROL, CONS-10
EF	CBLA-91, CBLA-122, CBLA-215, CBLA-104, CONS-11

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

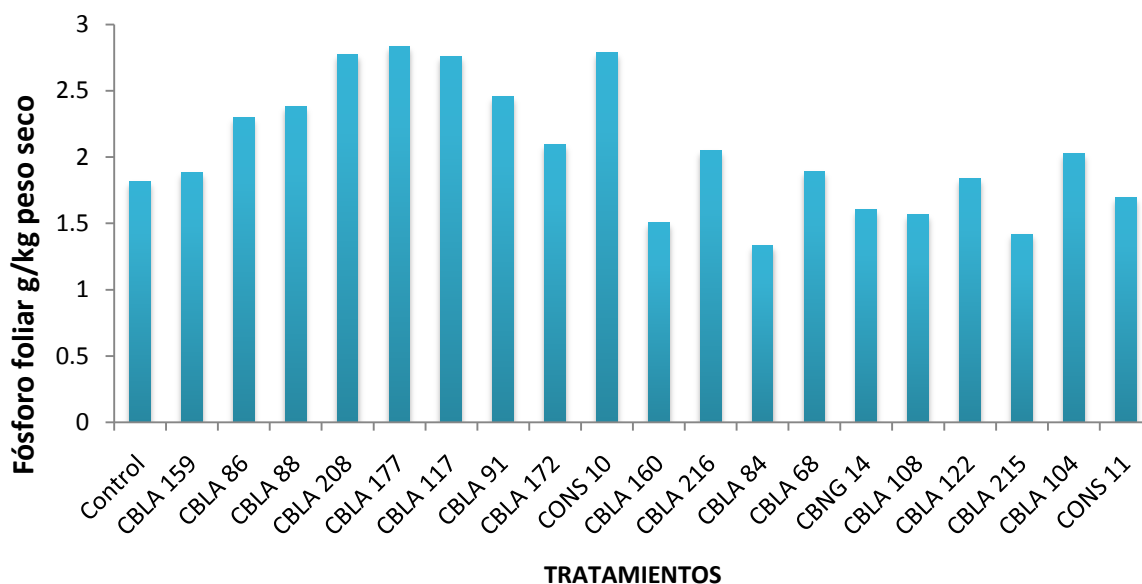


Figura 6: Fósforo foliar g/kg en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Floradade) inoculadas con diferentes BSP.

La Figura 6 Presenta los resultados obtenidos en cuanto a la variable Fósforo foliar en gramos por Kg de peso seco. Las plantas que obtuvieron los mejores

resultados con respecto al control fueron las plantas que se inocularon con las cepas CBLA-177 superándolo con un 56%, Consorcio 10 superándolo con un 53%, CBLA-208 superándolo con un 52% y CBLA-117 superándolo con un 51%, estas mostraron significancias estadísticas con respecto al control de acuerdo a la comparación de medias de Tukey (tabla 10).

Tabla 10: Agrupamiento Tukey para fósforo foliar gramo por kilogramo en plantas de tomate

Agrupamiento Tukey	Tratamiento
A	CBLA-177
AB	CONS-10, CBLA-208, CBLA 117
ABC	CBLA-91, CBLA-88
BCD	CBLA-86, CBLA-172
CDEF	CBLA-216, CBLA-104
DEF	LA-68, CBLA-159
EFG	CBLA-122, CONTROL, CBLA-108
FG	CBNG-14, CBLA-160, CBLA-215, CBLA-84

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

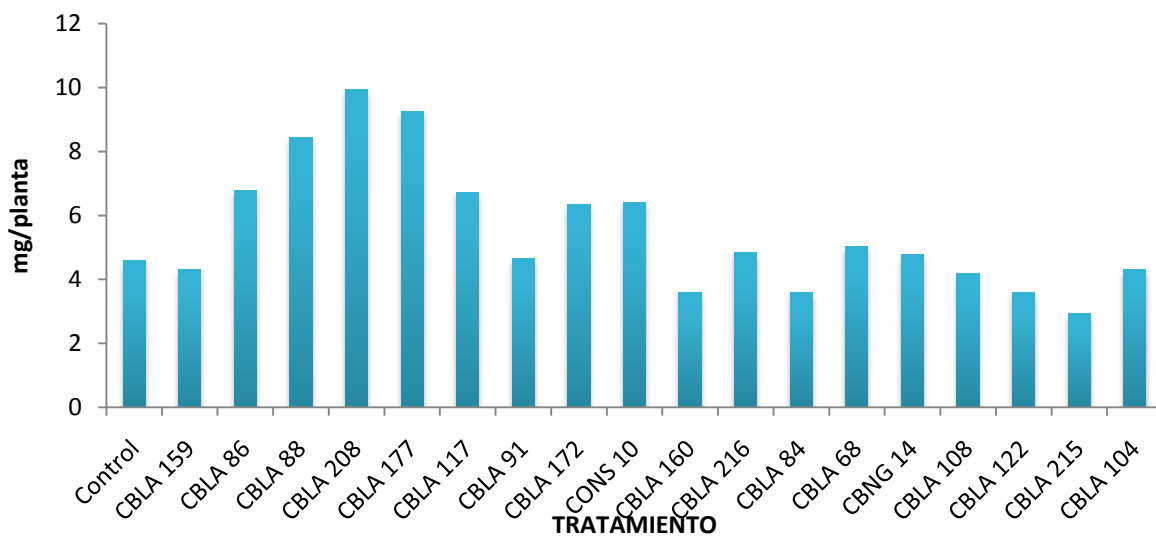


Figura 7: Fósforo foliar mg/planta en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Floradade) inoculadas con diferentes BSP.

La Figura 7 Muestra el comportamiento de los resultados de la variable Fósforo foliar en mg por planta. Las plantas que obtuvieron una mayor acumulación de P foliar por planta con respecto al control, fueron las inoculadas con las cepas CBLA 208 superándolo con un 116%, CBLA 177 superándolo con un 101% y CBLA 88 superándolo con un 84%, mostrándose estadísticamente significativas con respecto al control de acuerdo a la comparación de medias de Tukey (tabla 11).

Tabla 11: Agrupamiento Tukey para fósforo foliar mg/planta en plantas de tomate

Agrupamiento Tukey	Tratamiento
A	CBLA-208
AB	CBLA-177
B	CBLA-88
C	CBLA-86, CBLA-117, CONS-10, CBLA-172
D	CBLA-68, CBLA-216
DE	CBNG-14, CBLA-91, CONTROL, CBLA-104, CBLA-159
EF	CBLA-108, CBLA-160, CBLA-122, CBLA-84
F	CONS-11, CBLA-215

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

La cepa 208 que corresponde al género *Pseudomonas* sp, fue la cepa inoculada con mejores resultados ya que se manifestó satisfactoriamente en las variables de peso seco de raíz, peso seco de área foliar, fósforo foliar mg/kg y fósforo foliar mg/planta, sin embargo no obtuvo el mejor resultado en la variable índice de deficiencia de fósforo, como si lo obtuvo la cepa CBLA-172 que pertenece al mismo género, por otro lado en la variable altura de la planta también fue superado por la CEPA-84 que pertenece al género *Pseudomonas aeruginosa*.

También se encontraron cepas que obtuvieron resultados satisfactorios en algunas variables sin embargo, no lograron sobresalir en las otras, como es el caso de la cepa CBLA-172 que pertenece al género *Pseudomonas* sp obtuvo

buenos resultados en altura, peso seco de raíz, peso seco foliar y menor índice de deficiencia de fósforo, sin embargo en la asimilación de fósforo no obtuvo resultados sobresalientes. Otro caso fue la de la cepa CBLA-84 obteniendo mayor resultado en la altura pero sin embargo esta no pudo sobresalir en las demás variables.

Dichos casos confirman que existió otro fenómeno aparte de la asimilación de fósforo, lo que pudieron ser agentes promotores de crecimiento que ayudaron a un buen desarrollo de la planta.

## VII. CONCLUSIONES

De las 17 cepas y los dos consorcios estudiados solo algunas obtuvieron efectos benéficos en el cultivo de tomate, las que destacan son: la cepa CBLA-208 ya que obtuvo mayor peso seco de raíz, mayor peso seco de área foliar, mayor porcentaje de fósforo foliar mg/kg y mayor porcentaje de fósforo foliar mg/planta, mientras que la cepa CBLA-172 obtuvo menor deficiencia de fósforo, por otro lado la cepa que obtuvo mayor altura de la planta fue la cepa CBLA-84. Otras cepas que no destacan tanto, sin embargo sus resultados estuvieron por encima a las del control absoluto fueron CBLA-177 Y CBLA-88.

Los efectos más sobresalientes de algunas cepas sugieren que posiblemente existió un sinergismo entre hospedero y los simbioses, lo que permitió mejor la absorción de elementos esenciales, en nuestro caso el nutriente de interés el fósforo. Posiblemente las cepas inoculadas utilizaron mecanismos como la producción de ácidos orgánicos y ácido glucónico para la solubilización de fósforo ya que son los métodos más comunes para *Pseudomonas* (Illmer y Shinner, 1992).

Por otro lado el bajo o nulo efecto de las otras cepas en el crecimiento y desarrollo de las plantas se pudo deber a que las cepas no encontraron el medio adecuado en la rizosfera, ya que en general, para que los microorganismos pueden asociarse íntimamente a las raíces, tienen que escapar de los mecanismos de defensa de la planta y encontrar condiciones nutritivas y ambientales adecuadas para su establecimiento y desarrollo (Barea y Azcón-Aguilar, 1982).

## VIII. RECOMENDACIONES

En cuanto a las cepas que promovieron mayor asimilación de fósforo gramo por kilogramo, fósforo foliar mg por planta y mayor peso seco de raíz, se recomienda como candidatas a utilizarse en un proyecto a futuro a campo abierto donde puedan demostrar su capacidad solubilizadora y a la vez puedan ser estudiadas en dicho medio.



## IX. BIBLIOGRAFIA

- Arellano-Gil, M. y Gutiérrez-Coronado, M. 2006. Rendimiento y calidad poscosecha de Tomate bajo diferentes esquemas de fertilización al suelo. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 12(1): 113-118.
- Arzuaga, S., Fernández, C., Dalurzo, H., Vázquez, S. 2005. Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa acida en Entisoles, Alfisoles y Vertisoles de corrientes con diferentes usos agrícolas. *Comunicaciones científicas y tecnológicas. Resumen A-066.*
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16: 729-770.
- Begonia, M., Begonia, G.; Miller, G.; Gilliard, D. y Young, C. 2004. Phosphatase Activity and Populations of Microorganisms from Cadmium and Lead Contaminated Soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73:1025-1032.
- Boschetti, N.G., Quintero C.E., Benavidez, R.A., Giuffre, L. 2001. Destino del fósforo proveniente de diferentes fuentes de fertilizante fosfatado en suelos de la provincia de Entre Ríos. *Revista Científica Agropecuaria, FCA, UNER.* 5: 23-30.

Campos V., A.1992. La fertilización orgánica moderna una nueva alternativa para el productor agrícola. pp:198-204. In: Manejo y conservación del suelo y el agua. Dr. José Feliciano Ruíz Figueroa (Ed) Primera reunión nacional. 12 al 15 de Agosto de 1993. Montecillos , Edo. de México.

Chen, Y., Rocha, P., Arun, A., Shen, F., Lal, W. y Young, C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. 34: 33–41.

Coyne, M. 2000. Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio. Ed. Paraninfo. Madrid, España. Pag. 178-182.

Cruz B. L. 2007. Calidad de semilla de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) por efecto de potenciales osmóticos, calcio y podas bajo condiciones de invernadero. Tesis (Doctorado en Ciencias, Recursos Genéticos y Producción de Semillas), Colegio de postgraduados. p 177.

D'Arcy, W. G., 1991. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee y N. Estrada (eds.). Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry and Evolution. Great Britain, Royal Botanical Gardens, Kew, 75-137.

Drouillon, M. y Merckx, R. 2003. The Role of Citric Acid as a Phosphorus Mobilization Mechanism in Highly P-Fixing Soils. *GayanaBot.*60(1): 55-62.

Fankem, H., Nag, D., Deuel, A., Ding, L., Embrace, W yEtoa, F.X. 2006. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeisguineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology.* 5(24): 2450-2460.

Fernández, L., Zalba, P., Gómez, M. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cienc. Suelo*23(1):31-37.

García, C. 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Pp 49-58.

García-Serrano, P., Lucena M, J., Ruano C, S. y Nogales G, M. 2009. Guía práctica de la fertilización de cultivos en España, Parte I. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España. 266p.

Halder, A., K., and Chakrabarty, P., K. 1993. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.*38: 325–330.

- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O., Wani, P., Reddy G. 2006. Growth promotion of Maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from compost and macrofauna. *Microbial Research.*, 53: 65-71.
- Hilhorst, H.W.M., Groot S.P.C. y Bino RJ. 1998. The tomato seeds as a model system to study seed development and germination. *Acta Botanica Neerlandica* 47: 169-183.
- Hoffland, E. 1992. Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilization of rock phosphate by rape. *Plant Soil* 140: 279-289.
- Hyland, C., Ketterings, Q., Dewing, D., Stockin, R., Czymmek, K., Albrecht, G y Geohring, L. 2005. Phosphorus Basics. The Phosphorus Cycle. *Agronomy Fact Sheet Series: Nutrient Management Spear Program.*
- Illmer, P. and F. Schinner. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 24: 389-395.

Ivanova, R., Bojinova, D., Nedialkova, K. 2006. Rock Phosphate solubilization by soil bacteria. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*41(3):297-302.

Johnson, S.E. y Loeppert, R.H. 2006. Role of Organic Acids in Phosphate Mobilization from Iron Oxide. *Soil Science Society of America Journal*70: 222-234.

Jones J B Jr, Wolf B, and Mills H A 1991. The essential elements. In *Plant Analysis Handbook – A Practical Sampling, Preparation, Analysis, and Interpretation Guide*. Micro-Macro Publishing, Inc., Georgia, USA. p 187.

Liu, T. S., L. Y. Lee, C. Y. Tai, C. H. Hung, Y. S. Chang, J. H. Wolfram, R. Rogers, and A. H. Goldstein.1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinolinequinone. *J.Bacteriol.*174: 5814-5819.

López, M. 2010. Manejo agroecológico del sistema sorgo-frijol. Efecto sobre la fertilidad del suelo y microorganismos con potencial para biofertilizar agroecosistemas venezolanos. Tesis de Doctorado.

Postgrado en Ciencia del Suelo. Universidad Central de Venezuela.  
210p.

*Los biofertilizantes microbianos: Una alternativa para la agricultura en México. Del INIFAP del Centro de Investigación Regional Pacifico Sur. Campo Experimental Rosario Izapa. Publicado en marzo de 2010.*

Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press.  
London 2nd edition.889 pp.

Mite, F., Carrillo M., Espinosa, J. 1999. Influencia de la fertilización y el riego sobre el desarrollo. Nutrición y rendimiento de la palma africana en ecuador. Informaciones Agronomicas no 36.

Navarro S & G Navarro (2003). Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.488 pp.

Onthong, J., Gimsanguan, S., Pengnoo, A., Nilnond, C. y Osaki, M. 2007.Effect of pH and some cations on activity of acid phosphatase secreted from *Ustilagosp.* IsolatedFromAcid Sulphate Soil.*Songklanakarín J. Sci. Technol.* 29:275-286.

Peix, A, A, A Rivas-Boyer, PF Mateos, C Rodríguez-Barrueco, E Martínez-Molina & E Velazquez. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium* Mediterranean under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33:103-110.

Plcone, L.I. y Zamuner, E. 2002. Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *Informaciones Agronomicas del Cono Sur* 16:11-15.

Ramírez, R. y Morales, D. 1989. Comparación de cuatro métodos de análisis del fósforo del suelo para estimar el requerimiento de  $P_2O_5$  por el tomate (*Lycopersicum esculentum*). *Agronomía Tropical.* 39(1-3): 79-94.

Rashid, M.; Khalil, S.; Ayub, N.; Alam, S. y Latif, F. 2004. Organic Acids Production and Phosphate Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) under *in vitro* Conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(2):187-196.

Ridge E, Rovira A, 1971. Phosphatase activitt of intact young wheat roots under sterile and non-sterile conditions. *New Phytol.* 70: 1017-1026.

Rodríguez, H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17:319-339.

Rodríguez-Suppo, F. 1996. Fertilizantes y nutrición vegetal. AGT Editor, 3ra edición, pp. 69-73.

Rossi, S., Rollan, A., y Bachmeier, A. 2006. Biodisponibilidad de fósforo en un suelo del sur de Santa Fe (Argentina). Efectos de dos fuentes fosfatadas y sus mezclas con urea. *Agriscientia* 23(2): 91-97.

Steiner, A.A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil*. 15:134-154.

Tsai, S. y Rossetto, R. 1992. Transformacoes microbianas do fósforo. In *Microbiología do Solo. Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo. Campinas, Brasil.*

Vásquez P., Holguín G., Puente M., López A., y Bashan Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils*.30: 460-468.

Yúfera, Primo E.; Carrasco Dorrién, J.M. 1981. Química agrícola I: suelos y fertilizantes. Alhambra. Madrid. ES.472 p.

### **Recursos electrónicos**

- [www.edafologia.com.ar](http://www.edafologia.com.ar)



- SIAP (Servicios de información agroalimentaria y pesquera)  
2010. <http://www.siap.gob.mx>
- <http://www.clades.cl/revistas/8/rev8art4htm>

## X. ANEXOS

### Reactivos utilizados y su preparación:

- Molibdato de amonio  
6.25 g de molibdato de amonio  
50 mL. De agua destilada  
75 mL. de ácido sulfúrico 10 N  
Aforar a 250 ml. con agua
- ANSA. Ácido amino naftol sulfónico.  
0.25 g ANSA  
7.5 mL. Bisulfito de sodio 15%  
25 mL. sulfito de sodio 20%  
Aforar a 500 ml.  
Dejar reposar toda la noche y cubrir de la luz.
- Agua regia.  
300 mL HCl  
100 mL HNO<sub>3</sub>  
Aforar a 1 L.

