

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Recuperación de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo de Rizósfera de *Chloris submutica*, *Deschampsia cespitosa*, *Chloris virgata* y *Setaria adhaerens*

Por:

MARTHA LUCIA MATIAS PABLO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Recuperación de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo de Rizósfera de *Chloris submutica*, *Deschampsia cespitosa*, *Chloris virgata* y *Setaria adhaerens*

Por:

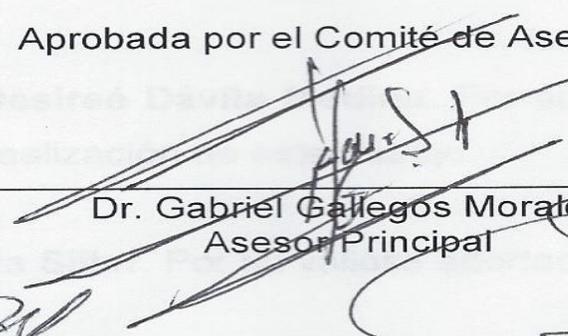
MARTHA LUCIA MATIAS PABLO

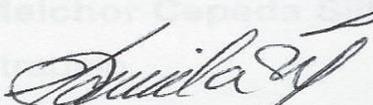
TESIS

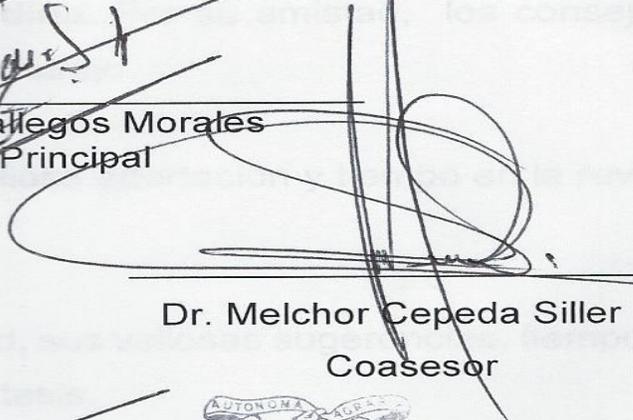
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

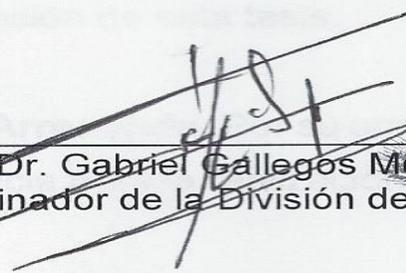
INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Gabriel Gallegos Morales
Asesor Principal


Dra. Miriam Desireé Dávila Medina
Coasesor


Dr. Melchor Cepeda Siller
Coasesor


Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación
de Agronomía
Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Eterno. Como un testimonio de gratitud por haber significado la inspiración que necesitaba para terminar mi carrera profesional.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Por el apoyo brindado durante estos años de estudio y como un reconocimiento de gratitud al haber finalizado mi carrera.

Al departamento de Parasitología. Por permitirme el uso de sus instalaciones para la realización de esta tesis.

Dr. Gabriel Gallegos Morales. Por abrirme las puertas para realizar la investigación, así como brindarme sus conocimientos y experiencia en el campo de la Microbiología.

A la Dra. Miriam Desireé Dávila Medina. Por su amistad, los consejos y su colaboración en la realización de este trabajo.

Dr. Melchor Cepeda Siller. Por su valiosa aportación y tiempo en la revisión de este trabajo.

M.C. Osvaldo Aguilar. Por su amistad, sus valiosas sugerencias, tiempo, ayuda y consejos para la realización de esta tesis.

Ing. Itandehui Esparza Arredondo. Por su amistad, y valiosas aportaciones que fueron de suma importancia para la realización de este trabajo.

A mis amigos por el apoyo, amistad cariño y comprensión que me brindaron en los momentos que más lo necesite, en forma incondicional y desinteresada. Les agradezco los consejos que me hicieron enderezar hacia el camino correcto y esa forma tan sutil de saberme guiar por el sendero del éxito.

DEDICATORIA

Con profunda admiración, cariño y respeto a mis padres **Luisa Pablo Reyes** y **Jesús Matías Martínez** que sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme quien la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho, por ser la esencia de todos mis triunfos y de toda mi vida.

A mi **linda abuelita**, que nunca dejo de creer en mí, me brindo el más dulce y puro amor, te amare por siempre mi Diru. Fuiste mi motivación para concluir este trabajo de tesis.

A mi **Querida hermana**, tu afecto y tu cariño son los detonantes de mi felicidad, tus palabras de aliento motivan mis ganas de ser mejor cada día, nunca dejaste de creer en mí, te agradezco por ayudarme a encontrar el lado dulce de la vida.

Con mucho cariño a **Josué Matías**, que sin duda es el mejor hermano que el Eterno me pudo dar.

Con amor y cariño a mi compañero de aventuras **Ing. Joaquín Hernández Escamilla**, que ha sido un gran ejemplo de superación, al cual admiro y respeto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVO GENERAL	3
Objetivos específicos.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
El presente de la agricultura	4
Impacto de la fertilización química.....	4
El fósforo	5
Importancia del fósforo en el suelo.....	5
El fósforo como elemento esencial en la nutrición de las plantas.....	6
Ciclo del fósforo	7
Fósforo orgánico.....	8
Fósforo inorgánico	8
Dinámica del fósforo	9
Mecanismos responsables de la solubilización de fosfatos.....	10
Solubilización	11
Producción de ácidos orgánicos.....	12
Oxidación- reducción del fósforo	13
Mineralización	13

Inmovilización	14
Producción de fosfatasas	14
Características de los suelos para un efectivo proceso de solubilización.....	14
Los microorganismos solubilizadores de fosfato	15
Bacterias endófitas	17
Bacterias solubilizadoras de fosfato	17
Bases para la selección de bacterias solubilizadoras de fósforo.....	18
Biofertilizantes	19
Bacterias solubilizadoras de fosfatos en diferentes cultivos	20
El tomatillo (<i>Physalis ixocarpa</i>).....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Área de trabajo	22
Sitio del muestreo	22
Medio de cultivo.....	22
Procesamiento de las raíces de las plantas	23
Aislamiento y purificación de las bacterias solubilizadoras de fosfato	23
Características coloniales y morfológicas de las bacterias.....	24
Presencia de pigmentos fluorescentes medio de cultivo B de King (KB)	24
Preparación de los inoculantes microbianos	24
Producción de ácidos orgánicos	25
Evaluación de capacidad de solubilización de fósforo por bacterias en el cultivo de tomatillo (<i>Physalis ixocarpa</i>)	25
Diseño experimental	26
Parámetros agronómicos.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27

Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato	27
Características coloniales y morfológicas de las bacterias	29
Presencia de pigmentos fluorescentes en medio de King B (KB).....	32
Producción de ácidos orgánicos	32
Evaluación del efecto solubilizador de bacterias <i>in vitro</i>	33
pH.....	34
Efecto de las bacterias seleccionadas en el crecimiento y desarrollo de plántulas de tomatillo (<i>Physalis ixocarpa</i>).....	35
Peso fresco de la planta de tomatillo	35
Diámetro del tallo.....	37
Número de flores	39
Número de ramas	40
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE CUADROS

1. Formas de fósforo inorgánico presente en suelo	9
2. Composición del medio National Botanical Research Institute Phosphate growth médium (NBRIP)	23
3. Composición del medio KB	24
4. Diluciones de los tratamientos en agua destilada esteril	26
5. Morfología microscópica de las cepas seleccionadas	29
6. Comportamientos coloniales de las bacterias solubilizadoras defosfatos.....	32
7. Composición del medio NBRIP modificado.....	34
8. Solubilización del medio NBRIP en base al pH.....	34
9. Efecto de la inoculación con las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 en el crecimiento y desarrollo de plantas de Tomatillo (<i>Physalis ixocarpa</i>).....	35
10. Efecto de la inoculación con las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 sobre el peso fresco de <i>Physalis ixocarpa</i>	36
11. Efecto de la inoculación con las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 sobre el diámetro del tallo de <i>Physalis ixocarpa</i>	38
12. Efecto de la inoculación con las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 sobre el número de flores de <i>Physalis ixocarpa</i>	39
13. Efecto de la inoculación con las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 sobre el número de ramas de <i>Physalis ixocarpa</i>	41

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Solubilización de compuestos inorgánicos del fósforo, para la producción de ácidos orgánicos	11
2. Diagrama esquemático de movilización del fósforo en el suelo e inmovilización por bacterias	12
3. Rangos de pH asociados a la solubilidad de fósforo por bacterias.....	15
4. Cepa 1. Aislada desde la rizósfera de <i>Chloris submutica</i>	27
5. Cepa 2. Aislada desde la rizósfera de <i>Deschampsia cespitosa</i>	27
6. Cepa 3. Aislada desde la rizósfera de <i>Chloris virgata</i>	28
7. Cepa 4. Aislada desde la rizósfera de <i>Setaria adhaerens</i>	28
8. Formación de halo de solubilidad <i>in vitro</i> para las cepas aisladas desde la rizósfera de <i>Chloris submutica</i> , <i>Deschampsia cespitosa</i> , <i>Chloris virgata</i> y <i>Setaria adhaerens</i>	29
9. Bacterias observadas en microscopio a 100x aisladas de la rizósfera de <i>Chloris submutica</i>	30
10. Bacterias observadas en microscopio a 100x aisladas de la rizósfera de <i>Deschampsia cespitosa</i>	31
11. Bacterias observadas en microscopio a 100x aisladas de la rizósfera de <i>Chloris virgata</i>	31
12. Bacterias observadas en microscopio a 100x aisladas de la rizósfera de <i>Setaria adhaerens</i>	32
13. Cambio de pH en medio NBRIP- ABT	33
14. Efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el peso fresco (T0: control absoluto T1: <i>Chloris submutica</i> ^(Z1) T2: <i>Deschampsia cespitosa</i> ^(Z2) T3: <i>Chloris virgata</i> ^(Z3) T4: <i>Setaria adhaerens</i> ^(Z4)) de <i>Physalis ixocarpa</i>	37
15. Efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el diámetro del tallo (T0: control absoluto T1: <i>Chloris submutica</i> ^(Z1) T2: <i>Deschampsia cespitosa</i> ^(Z2) T3: <i>Chloris virgata</i> ^(Z3) T4: <i>Setaria adhaerens</i> ^(Z4)) de <i>Physalis ixocarpa</i>	38
16. Efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el número de flores (T0: control absoluto T1: <i>Chloris submutica</i> ^(Z1) T2: <i>Deschampsia cespitosa</i> ^(Z2) T3: <i>Chloris virgata</i> ^(Z3) T4: <i>Setaria adhaerens</i> ^(Z4)) de <i>Physalis ixocarpa</i>	40

17. Efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el número de ramas
(T0: control absoluto T1: *Chloris submutica* ^(Z1) T2: *Deschampsia cespitosa* ^(Z2)
T3: *Chloris virgata* ^(Z3) T4: *Setaria adhaerens* ^(Z4)) de *Physalis ixocarpa*.....41

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue aislar bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) asociadas a la rizosfera de *Chloris submutica*, *Deschampsia cespitosa*, *Chloris virgata*, *Setaria adhaerens* y evaluar su capacidad para solubilizar fosfatos. Se tomaron muestras de las raíces, se maceraron y se realizó la siembra en medio de cultivo NBRIP modificado. Se evaluó el potencial solubilizador de fosfatos, además se determinó su efecto de inoculación sobre el crecimiento del tomatillo (*Physalis ixocarpa*). Cada una de las cepas tuvo un efecto positivo en al menos uno de los parámetros evaluados. Las cepas Z2 y Z3 aumentaron de manera significativa ($p \leq 0.05$) el peso fresco de la planta, con un incremento de hasta el 140.44% en comparación con el testigo, lo que reflejó aumentos en la biomasa. Las cepas Z2, Z3 y Z4 aumentaron el número de flores en comparación con el control absoluto y tuvieron un incremento hasta del 198.12 % respectivamente. La cepa Z2 mostró un incremento en el número de ramas seguido de la cepa Z3 y Z4. Los resultados obtenidos en el diámetro del tallo no mostraron diferencias estadísticamente significativas pero numéricamente hubo un incremento del 26.18% por parte de la cepa Z4 seguido de la cepa Z2 con un 25.45%.

Teniendo en cuenta estos preceptos, para la selección preliminar de bacterias solubilizadoras de fosfatos, en este trabajo, se recomienda utilizar medio NBRIP suplementado con diferentes fuentes de fósforo inorgánico, en correspondencia con el tipo de suelo donde éstas se pretendan aplicar como inoculante microbiano.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno y el fósforo son dos de los principales nutrientes de las plantas que se conocen como el elemento clave en la producción de los cultivos. El fósforo es el segundo macronutriente más importante, es un elemento esencial para la vida; forma parte de la estructura de numerosas moléculas de importancia metabólica, genética y es base de un gran número de compuestos (Salazar, 2005). En los suelos la disponibilidad del fósforo es esencial para el crecimiento vegetal porque constituye más de 0.2 % del peso seco de la planta (Banerjee *et al.*, 2010).

Los vegetales adquieren el fósforo por sus raíces y su disponibilidad en el suelo depende de varios factores. En general, es un elemento poco accesible debido al tipo de ciclo biogeoquímico que presenta, en el que los reservorios son rocas fosfatadas de naturaleza insoluble (Arzuaga *et al.*, 2005). Las formas inorgánicas del fósforo son solubilizadas por un grupo de microorganismos altamente especializados, de los cuales se destacan las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSP) (Kaur, 2014). Estas BSP pueden solubilizar el fósforo de fuentes orgánicas e inorgánicas por la acción de ácidos orgánicos y enzimas extracelulares (Chen *et al.*, 2006). Actualmente numerosas BSP de los Géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Enterobacter* y *Erwinia*, entre otras, presentan genes involucrados en el mecanismo de solubilización. Una de las principales formas de identificar la capacidad solubilizadora de estas bacterias es mediante la formación de halos de solubilización en los medios de cultivo. Algunas especies han sido ampliamente probados como biofertilizantes e inoculantes para aumentar el rendimiento de los cultivos (Karpagam y Nagalakshmi, 2014). Esto se demostró en el estudio realizado por Sánchez *et al.*, (2012) que inocularon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) con las cepas de *Pseudomonas putida* y *Enterobacter* sp. en condiciones de invernadero, alcanzando incrementos en los rendimientos entre el 17% y el 49% Caballero *et al.*, (2007) reportaron que cepas diazotróficas de *Burkholderia*, aisladas de la rizósfera y el rizoplano de tomate, tienen la capacidad de solubilizar fósforo mineral en ensayos *in vitro* y

señalaron a la producción de ácidos orgánicos como el mecanismo responsable de esta actividad.

Guang *et al.*, (2008) reportaron una correlación positiva entre el número de bacterias solubilizadoras de fosfato en la rizósfera y la toma de fosfato y rendimiento de grano en varios cultivos agrícolas. Sin embargo, el incremento de la contaminación ambiental específicamente de suelos se debe, en gran medida, a la aplicación de fertilizantes sintéticos, que, si bien se utilizan para incrementar el rendimiento de cosechas en suelos con deficiencias nutricionales, su presencia tiene efectos residuales como la acumulación de metales pesados y alto grado de formación de compuestos insolubles, principalmente fosfatos tricálcico y fosfatos de hierro (Orozco, 2006).

Para mitigar esta problemática ambiental, una alternativa es el uso de biofertilizantes a base de bacterias solubilizadoras de fosfatos ya que constituyen un componente vital para los agroecosistemas, su utilización en cultivos de interés ha proporcionado muchos beneficios económicos, sociales y ambientales para los agricultores y productores. Sin embargo el empleo de inoculantes bacterianos en la agricultura aun es limitado (Berc *et al.*, 2004; Christy y Ramalingam, 2005).

Conocer y reproducir las bacterias con actividad fosfato solubilizadora presente en los zacates representa ventajas, dado que es un recurso propio de la región, al igual que representan un medio económicamente atractivo y aceptable por la reducción de los costos de producción. Esto refuerza la necesidad de trabajar con cepas endófitas asociadas a las raíces de pastos como una alternativa biológica para su uso potencial a mediano plazo como fuente de biofertilizante y promover una agricultura sostenible.

HIPÓTESIS

Al menos una bacteria aislada de raíces de pastos (Poaceas) solubilizará compuestos de fósforo inorgánico y potenciará el crecimiento y desarrollo del cultivo de tomatillo verde.

OBJETIVO GENERAL

Aislar bacterias solubilizadoras de fosfatos a partir de la rizósfera de pastos, y evaluar su efecto por inoculación en el crecimiento de plantas de tomatillo en condiciones de invernadero.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar bacterias solubilizadoras de fosfatos a partir de la rizosfera de pastos.
- Caracterizar morfológicamente las bacterias solubilizadoras de fosfatos seleccionadas.
- Evaluar en condiciones de invernadero el efecto de la inoculación de bacterias que demostraron mayor capacidad solubilizadora, en el cultivo de tomatillo (*Physalis ixocarpa*), mediante parámetros agronómicos.

REVISIÓN DE LITERATURA

El presente de la agricultura

En la actualidad del área total del planeta (510 072 000 km²), el 71% corresponde a la parte acuática y un 29% a la parte terrestre, y sólo el 13% está destinado a la producción agrícola. En los últimos años, la tasa de crecimiento de la producción agrícola ha disminuido, por lo cual el objetivo de esta, es lograr altos rendimientos por unidad de superficie buscando satisfacer la creciente demanda de alimentos, sin considerar la sostenibilidad de la producción (viabilidad técnica, rentabilidad económica y contaminación).

Existen tres fuentes principales de crecimiento en la producción de cultivos, el incremento de la tierra cultivada, el aumento de la frecuencia de las cosechas y los rendimientos. Los éxitos de esta estrategia han sido importantes, pero sus métodos han demostrado ser ineficiente y altamente contaminantes, ocasionando la pérdida de la diversidad biológica, disminución de los recursos forestales, erosión del suelo, cambios climáticos, etc. que a su vez ha contribuido a la disminución de la superficie apropiada para la agricultura, con graves problemas ecológicos, económicos y sociales (FAO, 2002).

Impacto de la fertilización química

La fertilización con nitrógeno y fósforo (P) es una práctica común dirigida a aumentar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos ocasiona la pérdida de la micro y macrobiota, el agotamiento acelerado de la materia orgánica y un desbalance de nutrientes, que se refleja en la pérdida de la fertilidad y la baja productividad de los suelos, aunado a la contaminación del agua y las áreas naturales. Estos impactos representan una serie de amenazas para la salud humana y animal (Pedraza, 2008). Dado a las dificultades de suministro de los fertilizantes en especial los fosforados, diversos investigadores advierten sobre una inminente crisis, ya que las reservas mundiales de P se encuentran en un proceso de agotamiento (Cordell *et al.*, 2009; Vaccari, 2009). La distribución de estas reservas es

desigual; solo cuatro países: Marruecos, China, Sudáfrica y Jordania controlan el 83% de las reservas mundiales de fosfatos explotables (Vaccari, 2009). Tan solo en 2005 se extrajeron a nivel mundial aproximadamente 17.5 millones de toneladas de P y cerca de 14 millones de toneladas fueron utilizados para la elaboración de fertilizantes químicos. Del total de los fertilizantes fosfatados fabricados, casi 8 millones de toneladas se pierden por lixiviación y erosión. A esta desigualdad en las reservas P se añaden dificultades de suministro y desequilibrio lo que convierte al fósforo en un recurso geoestratégico, para la alimentación de la humanidad (FAO, 2005).

El fósforo

El P es uno de los tres macronutrientes esenciales de la vida en la tierra, componente clave de molécula como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP; además juega un papel importante en la regulación postraduccional de enzimas y el control de cascadas de señalización durante la transducción, participa en la fosforilación y desfosforilación en la señalización de proteínas, lo que hace del P el segundo factor nutricional limitante después del nitrógeno en las plantas (White y Hammond, 2008).

La demanda de P es dependiente del cultivo y del estado de desarrollo y se genera en función del rendimiento a alcanzar del cultivo, el índice de cosecha y su requerimiento interno. Por su parte, el suministro se entiende como aporte de nutriente por parte del suelo. Según Rodríguez *et al.*, (2001) el suministro de P en el suelo depende de dos parámetros: la disponibilidad del P y la eficiencia de absorción radicular de P en el cultivo.

Importancia del fósforo en el suelo

Este elemento lo podemos encontrar de cuatro formas en la solución del suelo (asimilable), fijado como arcillo húmico (cambiable o lábil), formando parte de la materia orgánica (precipitado como fosfato cálcico y adsorbido en geles de aluminio y hierro) y finalmente formando parte de la roca madre (no asimilable). Más del 90% del P total en el sistema suelo-planta-animal está en los suelos, y

menos del 10% en el resto de sistemas biológicos. El contenido de P en la litosfera es de aproximadamente 1200 mg kg^{-1} , mientras en los suelos se presenta en un rango de 200 mg Kg^{-1} . En las rocas primarias y en los suelos jóvenes, el P se encuentra unido principalmente al Ca y Mg, dando al P una solubilidad típica cercana a 0.5 mg L^{-1} . La meteorización de los minerales cambia la solubilidad del P, dado que los compuestos del Ca se lavan de manera preferencial, incrementándose la abundancia relativa del Fe y Al, por cuanto la solubilidad del P llega a ser controlada por los fosfatos de Fe (Fe-P) y de aluminio (Al-P), la cual es mucho más baja que la de los fosfatos de calcio (Ca-P) (Arai y Sparks, 2007).

En la hidrosfera, las concentraciones típicas de P total en las aguas negras, en el drenaje agrícola y en las aguas superficiales de los lagos son, respectivamente, 3-15, 0.05-1.0 y $0.01\text{-}0.04 \text{ mg L}^{-1}$ (Arai y Sparks, 2007).

El fósforo como elemento esencial en la nutrición de las plantas

El P es el segundo nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas. Los principales procesos bioquímicos, la fotosíntesis y la respiración, son activados por el P inorgánico y/o sus derivados orgánicos. Los ésteres de fosfato actúan, en general, como portadores energéticos en varias rutas metabólicas y como precursores de los ácidos nucleicos, mientras los fosfolípidos juegan un papel importante en la integridad y función de las membranas celulares (Calderón *et al.*, 2009; Maathuis, 2009; Sánchez, 2007).

En el cloroplasto, la homeostasis del fosfato regula el transporte de los azúcares fosforilados a través de la membrana y la síntesis de almidón (Raghothama y Karthikeyan, 2005). Este elemento apoya el almacenamiento de energía obtenida a partir de la fotosíntesis y del metabolismo de carbohidratos en forma de polifosfatos, los cuales son usados para el crecimiento y la reproducción vegetal (Prada, 2013). La mayor parte del P las plantas lo absorben en forma de fosfato diácido (PO_4H_2) y en menor proporción como fosfato monoácido (PO_4H). De hecho, la absorción del primero es diez veces más rápida que el segundo, aunque

hay que tener en cuenta que en ello influye notablemente el pH del suelo (Navarro y Navarro, 2003). Una concentración adecuada de P es responsable de un aumento en el crecimiento de las raíces, lo que significa que la planta pueda explorar más el suelo por los nutrientes y la humedad, por estas razones este elemento se presenta en la mayoría de las plantas en concentraciones entre 0,5 y 1% de materia seca. Por el contrario, con una deficiencia de P se desacelerará el crecimiento de la planta, debido a los cambios en la tasa de división celular, elongación, reducción en el número y tamaño de semillas y flores (Prada, 2013; Navarro y Navarro, 2003), también hay cambios fenológicos y dormancia en las plantas, lo que disminuye en gran medida el desarrollo vegetal. La insuficiencia de este elemento se evidencia en muchas ocasiones por cambios en la arquitectura de la raíz, lo cual implica su morfología, topología y patrones de distribución. De igual manera el P interviene en la formación de azúcares de cinco carbonos (ciclo de las pentosas), por tal motivo cuando hay falta de este elemento los carbonos utilizados en este ciclo no pueden formar azúcares. Estos carbonos son desviados a la formación excesiva de antocianinas lo que se observa fenotípicamente por un cambio gradual en la coloración del follaje empezando desde un verde oscuro en las hojas jóvenes a un púrpura en las hojas mayores, como consecuencia de la acumulación de dichos compuestos (White *et al.*, 2008).

Ciclo del fósforo

El ciclo del P en el suelo es un sistema dinámico y complejo que involucra la acumulación del elemento en la biomasa microbiana, materia orgánica y formas inorgánicas e incluyen fuentes de fósforo en cuatro formas generales: (1) P inorgánico disponible, (2) P orgánico, (3) P absorbido, y (4) P como mineral primario (Hyland *et al.*, 2005). La distribución de las diferentes formas de P en el suelo depende de factores que incluyen tipo de suelo, pH, tipo de vegetación, actividad microbiana y entradas de fertilizantes (Rooney y Clipson, 2009).

Fósforo orgánico

La cantidad de fósforo presente en forma orgánica (Po) en los suelos varía de unos pocos miligramos a casi 0.5 g Kg⁻¹ de suelo (20 a 80% del total) (Arai y Sparks, 2007). El contenido de Po depende de varios factores: clima, vegetación, textura, prácticas de fertilización, riegos, drenaje y uso del suelo; siendo varios de estos factores interdependientes. El tiempo de residencia media del Po en el suelo se ha estimado entre 350 y 2000 años (Kögel, 2006).

Tres grupos de compuestos forman la reserva de Po en el suelo: los inositol fosfato (ésteres de inositol fosfato), ácidos nucleicos y fosfolípidos. Estas formas dan cuenta del 50 al 70% del Po del suelo (Kögel, 2006). Debido a su gran estabilidad en el suelo, el inositol fosfato (ácido fítico o fitato), almacena más del 50% del Po, mientras el contenido de fosfolípidos comprende entre 0.5 – 7% del Po total. Los ácidos nucleicos, los cuales se originan a partir de la descomposición de microorganismos, animales y restos vegetales, es la fracción más pequeña (< 3% del Po total) (Arai y Sparks, 2007).

Fósforo inorgánico

El fósforo inorgánico (Pi) se encuentra formando parte de minerales de calcio, hierro y aluminio originados por mecanismos de precipitación y pueden liberar P muy lentamente por medio de la meteorización. Los compuestos de Pi pueden encontrarse en forma de sales en solución, sales cristalinas o sales absorbidas por los coloides del suelo (Cuadro 1); también pueden formar enlaces de gran estabilidad con hidróxidos de hierro, aluminio o manganeso y son menos solubles que los compuestos de fósforo orgánico (Bobadilla y Rincón, 2008).

El fósforo disponible para las plantas se encuentra en el suelo en forma de ortofosfatos, que son formas inorgánicas solubles, encontrándose iones monobásicos ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) y dibásicos (HPO_4^{-2}) (Banerjee *et al.*, 2010). Las formas iónicas del Pi son dependientes del pH. A valores de pH entre 4.0 y 6.0, la mayoría del Pi está presente como ión $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ forma que puede ser absorbida por las plantas, debido a su solubilidad en agua. A pH entre 6.5 y 7.5, el Pi en la

solución del suelo está presente principalmente como $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ y HPO_4^{-2} , forma esta última la cual también puede ser absorbida por las raíces de las plantas, pero en menor proporción que la primera. A pH entre 8.0 y 10.0, el ión HPO_4^{-2} es dominante.

Más allá de un pH de 10.0, la forma iónica dominante es el PO_4^{-3} , y a menos que esté presente como fosfato de sodio, el P no es disponible para las plantas. En el otro extremo, es decir, debajo de pH 3.0, el P está presente como H_3PO_4 , una forma química extremadamente reactiva, por lo que en suelos altamente ácidos, la fijación o reversión del fosfato es bastante rápida (Prasad y Power, 1997, Arai y Spark, 2007).

Cuadro 1. Formas de fósforo inorgánico presente en suelo

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 tricálcico	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Menor solubilidad
Fosfatos de hierro	Fosfato dicálcico	CaHPO_4	Mayor solubilidad
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$	Mayor solubilidad
	Livianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles
Fosfato de aluminio	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles
	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Poco solubles

Fuente: Bobadilla y Rincón 2008

Dinámica del fósforo

El P en el suelo es un elemento que sufre muchas reacciones, pero las de sorción y precipitación, son las que más influyen sobre la movilidad y disponibilidad de este elemento. En los procesos de sorción se diferencian la adsorción y absorción, en el primer proceso se forma rápidamente una capa de H_2PO_4 sobre

la superficie de aluminio sólido (silicatos de aluminio) o en las fracciones de hidróxidos de hierro; mientras que en la absorción se observa una penetración del P y otros compuestos por difusión lenta a través de los microporos de los agregados del suelo (arcillas, minerales, materia orgánica), lo cual dificulta aún más la liberación del fósforo debido a que el elemento se encuentra de manera interna en dichas estructuras (Rossi, 2011). Los procesos de sorción sobre la superficie de los coloides del suelo se debe a fuerzas electrostáticas, de Van der Waals o de tipo químico (Rodríguez y Fraga, 1999). El pH del suelo también influye en los procesos de sorción, ya que en suelos ácidos se fija el doble de cantidad de fósforo por unidad de área que en los suelos neutrales o calcáreos (Olsen y Watanabe, 1957; Holford, 1983). La disponibilidad del fósforo se ve afectada por los procesos de precipitación dependiendo del pH, el cual influye en la solubilización de los hidróxidos de hierro y aluminio, a un valor de pH por debajo de 6.5 se precipitan los iones H_2PO_4 con Fe^{3+} y Al^{3+} generándose como productos fosfatos amorfos de hierro y aluminio, así mismo a un valor de pH entre 7.5 y 8.5 se pueden formar sales sódicas de fosfato, las cuales aunque son más solubles en agua, tampoco son asimiladas por las plantas. Finalmente cuando hay altas concentraciones de calcio, a valores de pH mayores de 7.5, la concentración de H_2PO_4 es muy baja y el ión HPO_4 precipita por acción del calcio formando fosfato dicálcico, el cual es relativamente insoluble en agua, sin embargo estos precipitados amorfos son moderadamente disponibles para las plantas (Holford, 1983).

Mecanismos responsables de la solubilización de fosfatos

Los microorganismos realizan algunas transformaciones de los compuestos orgánicos e inorgánicos del fósforo; tales transformaciones se llevan a cabo por mecanismos como alteración en la solubilidad de los compuestos inorgánicos, mineralización de los compuestos orgánicos, inmovilización, oxidación-reducción de los compuestos inorgánicos (Alexander, 1987). Los mecanismos ampliamente aceptados como responsables de la solubilización microbiana del P mineral son: a) la producción de ácidos orgánicos, b) la producción de protones (normalmente

asociada a la asimilación de NH_4 y/o a los procesos respiratorios), y c) la producción de ácidos inorgánicos y CO_2 .

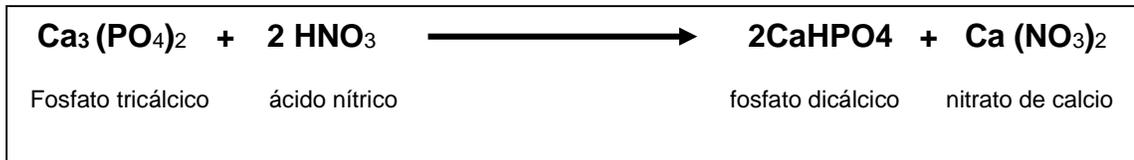


Figura 1. Solubilización de compuestos inorgánicos del fósforo, para la producción de ácidos orgánicos (Alexander, 1957)

Solubilización

Es el proceso esencial en el cual los microorganismos son intermediarios para las que plantas pueden llevar sus procesos de fotosíntesis, ya que por medio de este proceso las plantas pueden asimilar los compuestos inorgánicos insolubles, que se encuentran dispuestos en el suelo. La producción de ácidos orgánicos como el ácido sulfúrico y el ácido nítrico, son el principal medio para la solubilización mediante el proceso conocido como quelación.

Hay dos formas en las que se produce la solubilización: mediante la quelación de compuestos fosfatos insolubles, o por medio de la acción de los microorganismos con la producción de ácidos orgánicos. Los procesos de solubilización se ven favorecidos por niveles bajos de pH, alto contenido de materia orgánica, bajo contenido de calcio y la cantidad de P disponible en el suelo (Guerrero, 1996).

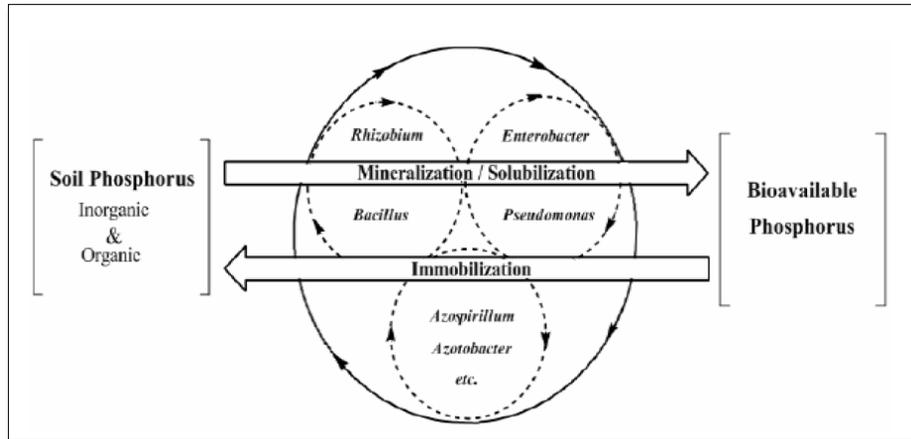


Figura 2. Diagrama esquemático de movilización del fósforo en el suelo e inmovilización por bacterias

Producción de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos actúan sobre compuestos insolubles de fosfato inorgánico como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxapatita y roca fosfórica. 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 de ácidos orgánicos 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 (Bobadilla y Rincón, 2008). 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 P quede en forma disponible, reduciendo la adsorción. La producción de ácidos orgánicos se da cuando los microorganismos realizan los procesos de solubilización del fósforo, los cuales actúan sobre compuestos de fosfato inorgánico insoluble: fosfato dicálcico, fosfato tricálcico, roca fosfórica e hidroxapatita. Por la descomposición de la materia orgánica se producen ácidos orgánicos de bajo peso molecular como: ácido cítrico oxálico, succínico, láctico,

acético, isovalerico, isobutirico. El tipo y la cantidad de ácido que se produzca van a depender de los tipos de microorganismos que intervengan en este proceso de solubilización. La presencia de los ácidos orgánicos causa un descenso de pH aproximadamente a 2, sin embargo con estos valores se pueden llevar a cabo el proceso de solubilización. Sin embargo estudios realizados, resaltan que la producción de ácidos orgánicos forman complejos solubles con iones metales: $Al^{3+}Fe^{3+}Ca^{2+}$, los cuales se encuentran asociados al fósforo soluble, reduciendo su adsorción y permitiendo que este quede en forma disponible (Rashid *et al.*, 2004).

Oxidación- reducción del fósforo

Los estados de oxidación del P van desde el -3 (fosfina) hasta el +5 (ortofosfato). Los microorganismos pueden realizar éstas transformaciones cuando al utilizar el fosfito lo transforma en fosfatos en el interior de la célula. Este proceso puede ser reprimido por inhibidores biológicos tales como tolueno. A través de este proceso se provoca la solubilización del fósforo al reaccionar con los iones del suelo (Hyland *et al.*, 2005).

Mineralización

Los microbios pueden convertir el fósforo orgánico a ortofosfato diácido (H_2PO_4) o fosfato monoácido (HPO_4), que son formas disponibles para las plantas. El fósforo orgánico puede ser mineralizado como subproducto de la descomposición de la materia orgánica, o mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por la demanda de este nutriente (Picone y Zamuner, 2002).

Estos procesos de mineralización se ven beneficiados por altas temperaturas, acidez en los valores neutros que ayuden a la liberación del fósforo y aumento en el pH. Este proceso se basa en tener una relación directamente con el sustrato, teniendo en cuenta que depende de la cantidad de fósforo orgánico que haya disponible, a mayor cantidad de sustrato el proceso de mineralización va a ser más rápido y eficiente.

Inmovilización

Se basa en la absorción de un nutriente que se encuentra en forma disponible por parte de los microorganismos y estos se encargan de convertirlo en un elemento orgánico no disponible.

Producción de fosfatasas

En la rizosfera, la presencia de un gran depósito de fósforo orgánico, el cual no puede ser utilizado por las plantas, enfatiza el papel de la flora microbiana en la producción de diferentes enzimas pertenecientes al grupo de las fosfatasas. Estas están involucradas en la mineralización del fósforo, y al parecer están reguladas por la expresión de varios genes (Bobadilla y Rincón, 2008). Las fosfatasas pueden ser sintetizadas, tanto por las raíces de las plantas (producen fosfatasas ácidas), como por ciertos grupos de bacterias y hongos capaces de producir fosfatasas ácidas y alcalinas (Tarafdar *et al.*, 1988).

Aunque gran parte de la actividad mineralizadora del fósforo orgánico ha sido atribuida a las micorrizas, es posible encontrar microorganismos asociados al proceso de descomposición de materia orgánica, que también realizan este proceso mediante la producción de fosfatasas.

Existen tres tipos de fosfatasas: ácida, alcalina y las fosfatasas con alta especificidad por el sustrato. Muchas de éstas han sido identificadas en una gran variedad de hongos. Dada la importancia de esta característica de la flora micótica, su presencia en la zona de la rizosfera resulta de gran valor para el crecimiento de las plantas (Bobadilla y Rincón, 2008).

Características de los suelos para un efectivo proceso de solubilización

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos se caracterizan por ser aerobios, pero cabe resaltar que también existen algunos microorganismos mesófilos, heterótrofos y facultativos con esta capacidad de solubilización de fosfato. Vargas (2012) resalta que este proceso de asimilación de fósforo por parte de las plantas se influencia por los niveles de pH en el suelo, a valores entre

6.5 a 7 se considera benéfico para la ocurrencia de este proceso, en comparación de suelos muy ácidos, donde este proceso de fijación de fosfato sería menor. En la Figura 3 se observa la relación que existe entre los diferentes rangos de pH que se asocian al proceso de solubilización por bacterias.

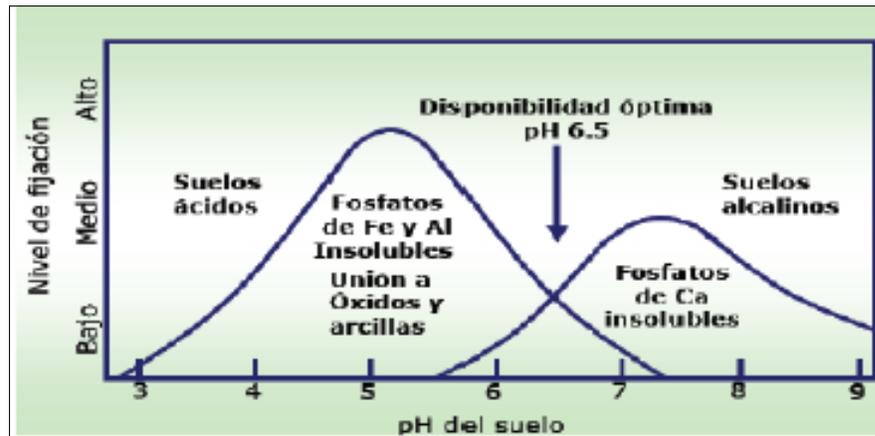


Figura 3. Rangos de pH asociados a la solubilidad de fósforo por bacterias

Teniendo en cuenta investigaciones realizadas acerca del proceso de solubilización de fosfato, se ha podido conocer que los factores como pH, temperatura, tipo de suelo, concentración de fósforo disponible y tipo de cultivo, entre otros, incide para que este proceso pueda ocurrir de forma eficiente (Vargas, 2012).

Los microorganismos solubilizadores de fosfato

Algunos microorganismos, especialmente los asociados con las raíces, tienen la habilidad de incrementar el crecimiento de las plantas y su productividad; estos son reconocidos como PGPM por sus siglas en inglés (Plant growth promoting microorganisms) (Rosas *et al.*, 2006). Los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) constituyen un grupo importante de PGPM, pues están involucrados en un amplio rango de procesos que afectan la transformación del fósforo, siendo componentes integrales del ciclo edáfico de este nutriente (Fankem *et al.*, 2006). En ambientes naturales, la rizósfera de diferentes especies

de plantas es afectada por los PGPM, incluidos los MSF; estos últimos microorganismos movilizan fosfato inorgánico insoluble desde la matriz mineral hasta el suelo donde puede ser absorbido por las raíces, y las plantas les suministran compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento microbiano (Pérez *et al.*, 2007). El papel de los MSF en la solubilización de fosfatos inorgánicos se conoció hacia 1903 (Kucey, 1983) y desde entonces han sido extensivos los estudios. La solubilización natural de fosfatos es un fenotipo natural que exhiben muchos microorganismos del suelo. Los MSF se encuentran en todos los suelos y su número varía de uno a otro (De Freitas *et al.*, 1997); en la rizosfera se ha encontrado una concentración más alta y eficaz de MSF en comparación con los encontrados en el suelo no rizosférico (Rodríguez *et al.*, 2001). En general, parece existir un efecto rizosférico sobre dichos organismos (Gómez y Zabala, 2001), debido a que los exudados radicales y detritus vegetales proporcionan el sustrato energético para que sea posible la actividad microbiológica solubilizadora de fosfato (Valero, 2003). En esta zona de interacción se encuentran cepas aeróbicas y anaeróbicas, con prevalencia de cepas aeróbicas (Rodríguez y Fraga, 1999). Las bacterias son los microorganismos predominantes que solubilizan fosfato mineral en los suelos si se comparan con los hongos y los actinomicetos (Kucey, 1983; Guang *et al.*, 2008). Por otra parte, la mayoría de los microorganismos solubilizadores pueden solubilizar complejos de fosfato de calcio y sólo algunos pueden solubilizar fosfato de aluminio o hierro (Banik y Dey, 1983; Gyaneshwar *et al.*, 2002). Estos microorganismos del suelo están implicados en la liberación de P desde fuentes inorgánicas por medio de la solubilización y desde fuentes orgánicas a través de la mineralización (Fankem *et al.*, 2006). La biomasa microbiana en el suelo contiene una cantidad significativa de fósforo inmovilizado que es potencialmente disponible para las plantas (Oberson *et al.*, 2001). Algunos microorganismos solubilizadores de fosfato pueden mostrar otras actividades de promoción de crecimiento vegetal como producción de ácido indol acético (AIA), ácido giberélico, citoquininas, etileno, ácido cianhídrico (HCN), fijación asimbiótica de nitrógeno y resistencia a patógenos del suelo; estas características son

necesarias para que un microorganismo sea considerado un potencial y eficiente bioinsumo (Banerjee *et al.*, 2010).

Bacterias endófitas

Las bacterias endófitas son aquellas aisladas de tejidos de plantas desinfectadas superficialmente o de su interior, ya que no causan síntomas visibles de enfermedad (Pérez *et al.*, 2010). Estudios indican que las bacterias endófitas ejercen control biológico sobre Fitopatógenos (Sessitch *et al.*, 2002), promueven el crecimiento en las plantas hospederas, aumentan la resistencia a enfermedades (Tsaykelova *et al.*, 2007). Contribuyen a la solubilización de fosfatos (Hameeda *et al.*, 2008) y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (Berg *et al.*, 2005).

Bacterias solubilizadoras de fosfato

A partir del año 2000, el conocimiento sobre los microorganismos solubilizadores de fosfato ha aumentado significativamente. Dentro de este grupo funcional se encuentran las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) que incluyen algunos géneros de actinomicetos. Las BSF pueden ser de vida libre en el suelo o establecer relaciones simbióticas con algunas plantas, son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta y favorecer su crecimiento o desarrollo por medio de la solubilización de fosfato inorgánico de diferentes compuestos como son el fosfato dicálcico, fosfato tricálcico y rocas fosfóricas (Patiño, 2010).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico tienen la propiedad de revertir los procesos de fijación de P por lo que se han relacionado con el incremento de este elemento en el suelo, diferentes especies bacterianas tienen la capacidad de solubilizar compuestos fosfatados inorgánicos insolubles como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfato (Chen *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 2006 y Mkanová, 2002).

Entre los géneros bacterianos más estudiados por su capacidad para solubilizar fosfatos se encuentran: las que solubilizan las formas orgánicas *Bacillus*

megaterium, *Bacillus mesentericus* y *Pseudomonas putida* (Das et al., 2003). Los que solubilizan formas inorgánicas *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Rhizobium*, y *Serratia* (Niklitschek, 2008). Constituyendo continuamente el 30% de la población de microorganismos que forman la rizosfera, (Rodas, 2006).

Rodríguez y Fraga (1999), reportan la existencia de 12 géneros de bacterias con la capacidad solubilizar fosfato, encontrándose entre ellos: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Erwinia*. Beneficiando en gran parte al proceso de solubilización de fosfato, encontrándose la mayor parte en la rizósfera y en el suelo. Estos microorganismos se desarrollan en medios con apatita, materiales insolubles, fosfato tricálcico, utilizándolas como única fuente de carbono de igual manera solubilizan gran parte de estos elementos y los liberan en una cantidad superior a su demanda nutricional común.

Hanke (2005), reporta que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aerobacter* son Géneros eficientes movilizadores de fosfato en la rizosfera, teniendo en cuenta sus condiciones físicas y la composición orgánica que representa en los abonos orgánicos fermentados, constituyendo así un 10% de la población bacteriana que activamente realiza estos procesos de solubilización.

En el suelo, las bacterias solubilizadoras de fosfato constituyen de 1% a 50% y los hongos con dicha actividad de 0,1% a 0,5 % del total de la población respectiva. En general, las bacterias solubilizadoras superan en número a los hongos de 2 a 150 veces (Banik y Dey, 1983; Kucey et al., 1989; Gyaneshwar et al., 2002).

Bases para la selección de bacterias solubilizadoras de fósforo

Para el aislamiento y selección de BSP, se ha reportado en la literatura diferentes medios de cultivos que incluyen en su composición variadas fuentes de P, tanto de origen orgánico como inorgánico. Uno de los más antiguos es el Pikovskaya (PVK) o medio Sperber el que presenta en su composición fosfato tricálcico (Ca_3

(PO_4)₂) y se utiliza para aislar BSF a partir de muestras de suelo, raíces y rizosfera. En 1992, se diseñó un nuevo medio de cultivo con igual fuente de Pi y finalmente, en 1999, se formuló el medio NBRIP, que ha sido uno de los más usados por su eficiencia para seleccionar microorganismos con alta capacidad para solubilizar fuentes de fósforo inorgánico (Pi).

Muleta *et al.*, (2013) al respecto indican que la mayoría de los aislamientos Gram positivos y algunos Gram negativos pueden perder su capacidad de solubilizar fosfatos tras repetidos subcultivos.

Biofertilizantes

Los biofertilizantes o abonos biológicos están basados en microorganismos que promueven y benefician la nutrición y el crecimiento de las plantas, se trata de microorganismos del suelo, generalmente hongos y bacterias, que se asocian de manera natural a las raíces de las plantas de una forma más o menos íntima. Estos microorganismos pueden facilitar de manera directa o indirecta la disponibilidad de determinados nutrientes tales como: nitrógeno el fósforo y agua (Glick, 1995).

Las tendencias mundiales van encaminadas hacia la agricultura sostenible, para la que se debe fomentar aún más el uso y tratamiento efectivo de los recursos naturales. En tal sentido, los biofertilizantes o inoculantes microbianos constituyen un componente vital para los agroecosistemas ya que son económicamente más atractivos y aceptables para reducir el uso indiscriminado de sustancias químicas y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos (Mejía, 1995). Su utilización en cultivos de interés ha proporcionado muchos beneficios económicos sociales y ambientales para los agricultores y productores por las propiedades de estos microorganismos para modificar las características del suelo y mantener el balance nutricional. Ellos producen metabolitos que facilitan la descomposición de la materia orgánica e incrementan el contenido de humus en el suelo. Todo ellos incide favorablemente sobre el crecimiento de las plantas y la calidad de las cosechas así como en el mejoramiento de la estabilidad

química física y biológica de los suelos. (Berc *et al.*, 2004; Christy y Ramalingam, 2005).

Bacterias solubilizadoras de fosfatos en diferentes cultivos

Varios ensayos han demostrado que la inoculación con hongos y bacterias solubilizadoras de P pueden incrementar el rendimiento el crecimiento de las plantas en invernadero y campo (Chuang *et al.*, 2007). Supanjani *et al.*, (2006) y Han *et al.*, (2006), encontraron que la aplicación de *Bacillus megaterium* var. *Phosphaticum* (Bmp) junto con roca fosfórica (RF) produjo incrementos en varios parámetros de crecimiento y rendimiento, en cultivos de ají y pepino, en condiciones de invernadero y campo.

En Argentina en estudios realizados en la Facultad de Ciencia Exactas y Naturales de la universidad Nacional de la Pampa sobre rizósfera de alfalfa, se obtuvieron nueve aislamientos de bacterias solubilizadoras de fósforo que fueron caracterizados fenotípicamente y metabólicamente, comprobándose también su efecto promotor de crecimiento (Grassano *et al.*, 2003).

Por otro lado, Mohammed *et al.*, (1998), informaron que en la Pampa Húmeda la inoculación de trigo con *Pseudomonas* spp. produjo incrementos de rendimientos de grano y que estos fueron similares a los producidos por la aplicación de fósforo. En el caso de *Pseudomonas aurantiaca* SR1, cepa aislada de la rizósfera de soja en Rio Cuarto, Córdoba, se observó que tiene propiedades promotoras de crecimiento y la capacidad de inhibir el crecimiento de diversos hongos, tales como *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Pythium* spp., *Sclerotinia minor* y *Sclerotium rolfsii* (Rosas *et al.*, 2006).

Leaungvutiviroj *et al.*, (2010), reportaron la inoculación de maíz y brócoli chino con una mezcla de una cepa solubilizadora de P de *Burkholderia unamae* + *Bacillus subtilis* (BSK) + el diazótrofo *Azotobacter tropicalis* + la cepa KJB9, productora de auxinas, generó un incremento del peso seco de 4.14 a 8.76 g planta⁻¹ en el caso del maíz, y de 11.1 a 40.8 g planta⁻¹ en el caso del brócoli. Cuando, además de la mezcla de los microorganismos se adicionó roca fosfórica (RF) y polvo de feldespatos, la masa seca aumentó a 10.2 g planta⁻¹ en el maíz,

y 79.9 g planta⁻¹ en el caso del brócoli, un aumento de casi 4 y 7 veces, respectivamente.

El tomatillo (*Physalis ixocarpa*)

En México se cultivan comercialmente alrededor de 49 hortalizas. En cuanto a superficie sembrada, el tomate de cascara (*Physalis ixocarpa*) ocupa el quinto lugar, solo superado por chile *Capsicum annuum* L., papa *Solanum tuberosum* L., jitomate *Solanum lycopersicum* L. y cebolla *Allium cepa* L. (SIAP, 2012). El tomate de cascara se cultiva en 29 de los 32 estados del país, sobre una superficie de 43.505ha en 2012, con una producción de 595.197t, y un rendimiento medio de 14,37t·ha (SIAP, 2014). De la superficie cultivada en 2012, el 74.32% fue bajo condiciones de riego y el 25.68% fue bajo temporal (SIAP, 2014). Los principales estados productores son Sinaloa Jalisco, Sonora, Puebla, Nayarit, Estado de México, Michoacán, Hidalgo, Morelos, Guanajuato y Tlaxcala (SIAP, 2014).

En los últimos 10 años, en México se ha venido incrementando la superficie de cultivo de esta hortaliza en un 4,4% (Fundación Produce Puebla, A.C. 2007), debido a que es un buen sustituto del jitomate, por ser un cultivo que no requiere muchos cuidados y por tener una muy buena aceptación en el mercado nacional y extranjero, además de ser una hortaliza de un ciclo vegetativo corto (Fundación Produce Sinaloa, A. C. 2007).

La dinámica agrícola del cultivo del tomate de cáscara demanda la generación de cultivares mejorados que se ajusten a las necesidades actuales del mercado nacional e internacional. Entre las características a mejorar destacan el rendimiento, hábito de crecimiento, distribución de la producción, así como color, forma y tamaño de fruto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de trabajo

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) y en Invernaderos del campo experimental “El bajío” de Mayo 2016 a 2017.

Sitio del muestreo

En el Campo Experimental “El Bajío” de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) se realizó un muestreo aleatorio. En cada sitio se colectó una planta completa (incluyendo raíces) de diferentes especies de pastos, la planta fue sacudida para eliminar el exceso de tierra adherida a sus raíces, se depositó en una bolsa plástica (Pérez, 2014). Para su traslado al laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología.

Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado para el aislamiento de cepas y la prueba de solubilización de fosfato fue el medio National Botanical Research Institute Phosphate growth médium (NBRIP), su composición se muestra en el Cuadro 2. El medio fue preparado en líquido y solidificado mediante la adición de 20 g/l de agar bacteriológico. El medio sólido fue empleado para el aislamiento, selección y caracterización de las bacterias solubilizadoras de fosfatos. El medio líquido para evaluar la capacidad solubilizadora *in vitro* de las bacterias caracterizadas como solubilizadoras de fosfatos.

Cuadro 2. Composición del medio National Botanical Research Institute Phosphate growth médium (NBRIP)

Componente	g/L
Dextrosa	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.15
KCl	0.2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25
MgCl ₂ 6H ₂ O	5
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
Agar	20
pH	7.2

Fuente: Nautiyal, 1999

Procesamiento de las raíces de las plantas

En condiciones asépticas las plantas se sometieron a un proceso de desinfección superficial. Se lavaron con agua destilada estéril se cortaron en segmentos de 1 cm aproximadamente. El proceso de desinfección se realizó con base en la metodología propuesta por Pérez *et al.*, (2010). Después, cada raíz se colocó en un tubo con agua destilada estéril y posteriormente con ayuda de una varilla de vidrio esterilizada se procedió al macerado hasta obtener un macerado fino, dicho macerado se dejó reposar por aproximadamente una hora.

Aislamiento y purificación de las bacterias solubilizadoras de fosfato

Una vez transcurrido el tiempo, se tomó una gota de la suspensión con el asa bacteriológica y se sembró por estría en placas, en medio de cultivo selectivo NBRIP siguiendo la metodología descrita por Nautiyal (1999). Las cajas se llevaron a una incubadora a 28°C por 48 horas, al final del periodo de incubación se seleccionaron las bacterias que mostraron actividad solubilizadora de fosfato, la cual estuvo representada por la aparición de halos claros alrededor de las colonias (Chakraborty *et al.*, 2010). Se realizó el proceso de purificación de los aislamientos.

Características coloniales y morfológicas de las bacterias

En la identificación de las bacterias con mayor actividad solubilizadora de fosfato se tuvieron en cuenta la morfología de las colonias, tamaño, color, borde, elevación y la forma de la superficie (Molano, 2004). Se realizó la tinción de Gram según la metodología descrita por Schaad *et al.*, (2001), para comprobar la pureza y determinar las características micromorfológicas y tintoriales. Las observaciones se hicieron entre las 24 y 48 h en un microscopio (Motic modelo: BA210E) a 40 x y 100x acompañadas de registros fotográficos.

Presencia de pigmentos fluorescentes medio de cultivo B de King (KB)

La prueba fue realizada utilizando el medio KB (King *et al.*, 1954). La composición del medio se muestra en el Cuadro 3

Cuadro 3. Composición del medio KB

Componente	g/L
Peptona de proteasa	20
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5
Glicerol	15
pH	7.2
Agar	20

Fuente: King *et al.*, 1954

A las cepas seleccionadas también se les realizó la prueba de fluorescencia, en placas ya previamente preparadas con el medio de cultivo B de King (KB) se sembraron por estría y se incubaron a 28°C (King *et al.*, 1954).

La determinación de fluorescencia se realizó después de 48 horas de incubación. Las placas fueron observadas en una cámara oscura bajo luz ultravioleta.

Preparación de los inoculantes microbianos

En condiciones asépticas los inoculantes microbianos se prepararon a partir de los cultivos puros en placa de las cepas en evaluación, se extrajo con un asa bacteriológica, una colonia característica la cual fue inoculada en 300 ml de

medio líquido NBRIP con un pH 6.8 y posteriormente incubada por 48 horas a 28°C manteniendo una agitación constante de 150 rpm en un agitador de marca shaker. A estos preparados bacterianos se les llamo bioinoculantes.

Producción de ácidos orgánicos

Las cepas purificadas se inocularon en 300 ml de medio líquido NBRIP-ABT con un pH de 6.8 manteniendo una agitación constante de 150 rpm en un agitador de marca shaker por cinco días a 28°C el cual permitió observar la producción de ácido por un cambio de coloración de azul a amarillo (Muleta *et al.*, 2013).

Evaluación de capacidad de solubilización de fósforo por bacterias en el cultivo de tomatillo (*Physalis ixocarpa*)

El tomatillo (*Physalis ixocarpa*) fue empleado como planta modelo por su crecimiento rápido, produce cosechas en un tiempo corto y realiza una gran absorción de fósforo del suelo (Hewitson y Price, 1994).

Las plantas de tomatillo fueron establecidas en un invernadero del campo experimental “El bajío” en una cama con acolchado de tres metros y medio de largo, por un metro de ancho y con un sistema de riego por goteo. Para determinar si las bacterias tenían efecto sobre parámetros de crecimiento de plantas de tomatillo, se realizaron tres aplicaciones del bioinoculante con ayuda de una mochila de aspersión. En el Cuadro 4 se muestran las diferentes diluciones utilizadas. El cultivo fue monitoreado constantemente y con riegos periódicos para mantener el suelo a capacidad de campo.

Cuadro 4. Diluciones de los tratamientos en agua destilada esteril

Tratamientos	ml. del bioinoculo /L de agua
T1	15 ml/L
T2	15 ml/L
T3	15 ml/L
T4	15 ml/L
Control absoluto	Agua

Para cada uno de los tratamientos se añadieron 60 ml de bioinoculo en cuatro litros de agua destilada.

Diseño experimental

La distribución de los tratamientos en el área experimental se llevó a cabo mediante un diseño completamente al azar, la unidad experimental consto de 5 tratamientos, con 10 repeticiones, lo que arrojó un total de 50 unidades experimentales.

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza y prueba media de Tukey, ($P= 0.05$) con el programa estadístico JMP 8.

Parámetros agronómicos

Peso fresco (PF) Se desprendió la parte aérea de la parte radicular de la planta, mediante un corte en la base, posteriormente las muestras se pesaron en una báscula electrónica IBN modelo B-6.

Diámetro del tallo (DT) Para la medición de este parámetro, se utilizó un Vernier digital y se hizo de la parte basal del tallo, a una altura de 2 a 3 cm, por arriba de la superficie del suelo, la medición se realizó en milímetros. Midiéndose diez tallos por unidad experimental para obtener un valor medio.

Número de flores (NF) Se realizó por el conteo directo, cuando la flor estuvo completamente abierta.

Número de ramas (NR) Se cuantifico directamente cada una de las plantas por tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato

En el proceso de aislamiento se seleccionaron 4 cepas bacterianas una de cada pasto y se les identificó con los siguientes nombres: Z1 (*Chloris submutica*), Z2 (*Deschampsia cespitosa*), Z3 (*Chloris virgata*) y Z4 (*Setaria adhaerens*).



Figura 4. Cepa 1 Aislada desde la rizósfera de *Chloris submutica*



Figura 5. Cepa 2 Aislada desde la rizósfera de *Deschampsia cespitosa*



Figura 6. Cepa 3 Aislada desde la rizósfera de *Chloris virgata*



Figura 7. Cepa 4 Aislada desde la rizósfera de *Setaria adhaerens*

Todas presentaron actividad solubilizadora de fosfato, dado que mostraron una zona translúcida que corresponde con el halo de solubilización (Figura 8) y alcanzaron un máximo de 5 mm, resultados similares a los reportados por Gupta *et al.*, (2010), Yu *et al.*, (2012) y Muleta *et al.*, (2013), quienes encontraron que la mayoría de las BSP asociadas a la rizósfera de plantas de café y stevia (*Stevia rebaudiana*), formaron halos de solubilización con diámetro superior a los 5 mm después de cinco días de incubación. Según Whitelaw (2000), el tamaño del halo y la colonia se correlaciona con la eficacia de la solubilización del fosfato.

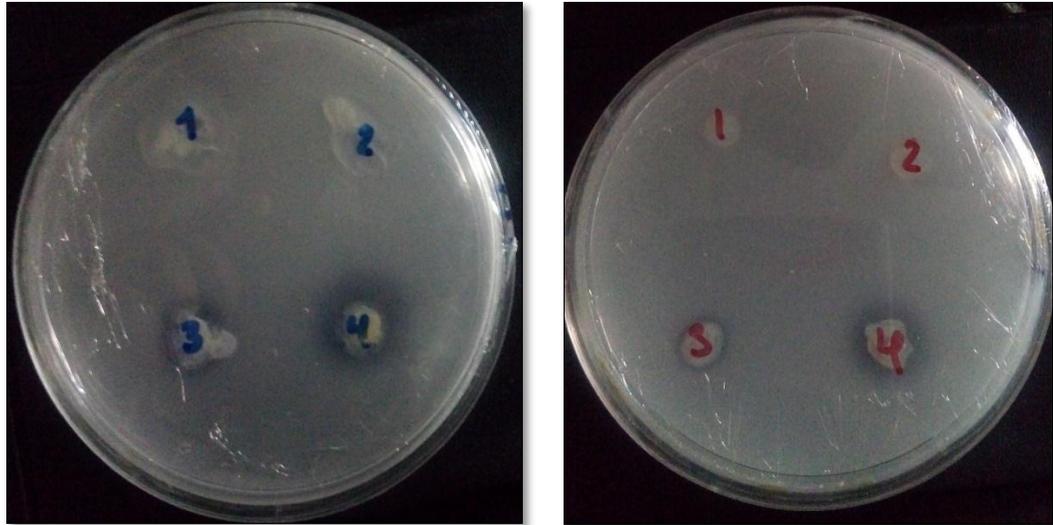


Figura 8. Formación de halo de solubilidad *in vitro* para las cepas aisladas desde la rizósfera de 1 *Chloris submutica*, 2 *Deschampsia cespitosa*, 3 *Chloris virgata* y 4 *Setaria adhaerens*

Características coloniales y morfológicas de las bacterias

Los aislamientos Z1, Z2, Z3 y Z4 respectivamente, presentaron formas bacilares rectas o ligeramente curvadas, mediante el uso de la coloración de Gram, se logró evidenciar que todas las bacterias aisladas correspondían a bacilos Gram negativos (Cuadro 5); esto concuerda con estudios realizados por Bobadilla y Rincón (2008) y con lo reportado por Martínez y García (2010) y Lara *et al.*, (2011), quienes señalaron que las poblaciones de BSF relacionadas a la rizósfera de guayaba agria (*Psidium araca* Swartz), eran predominantemente bacilos Gram negativos.

Cuadro 5. Morfología microscópica de las cepas seleccionadas

Cepa	Pared celular (Gram)	Forma
Z1	Negativo	Bacilar
Z2	Negativo	Bacilar
Z3	Negativo	Bacilar
Z4	Negativo	Bacilar

Se observó morfología colonial como se muestra en el Cuadro 6. Aunque la cepa Z1 y Z2 son similares no se descartaron ya que se tomaron de zacates diferentes y así comprobar su capacidad solubilizadora. Cabe mencionar que la cepa Z1 mostró mayor resistencia tras repetidas siembras, pero al cabo de 12 meses todas las cepas perdieron la habilidad solubilizadora hecho concordante con lo mencionado por Muleta *et al.*, (2013) quienes reportaron que la mayoría de los aislamientos Gram positivos y algunos Gram negativos pueden perder su capacidad de solubilizar fosfatos tras repetidos subcultivos.

La cepa Z1. Macroscópicamente se observaron colonias de 2 a 4 mm de diámetro de forma circular, borde entero, color crema y consistencia cremosa.

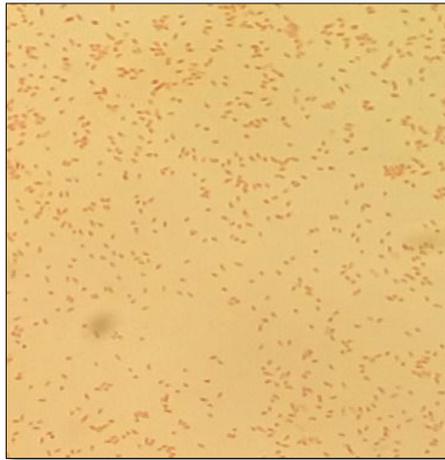


Figura 9. Bacterias observadas en microscopio a 100x aisladas de la rizósfera de *Chloris submutica*

La cepa Z2. Macroscópicamente se observaron colonias de 1 a 2 mm de diámetro de forma circular, borde entero, color crema y consistencia cremosa.

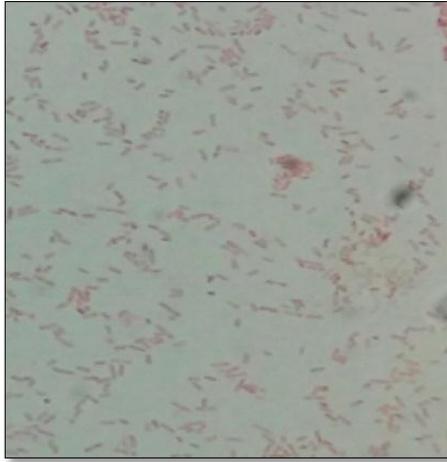


Figura 10. Bacterias observadas en microscopio a 100x aisladas de la rizósfera de *Deschampsia cespitosa*

La cepa Z3. Macroscópicamente se observaron colonias de 2 a 4 mm de diámetro de forma circular, borde entero, color crema y consistencia cremosa.



Figura 11. Bacterias observadas en microscopio a 100x aisladas de la rizósfera de *Chloris virgata*

La cepa Z4. Macroscópicamente se observaron colonias de 1 a 2 mm de diámetro de forma circular, borde entero, consistencia cremosa, color amarillo claro y consistencia cremosa.

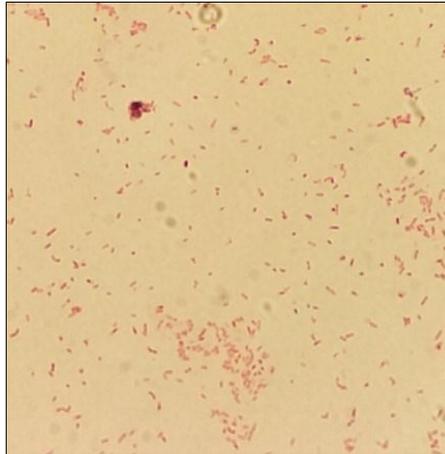


Figura 12. Bacterias observadas en microscopio a 100x aisladas de la rizósfera de *Setaria adhaerens*

Cuadro 6. Comportamientos coloniales de las bacterias solubilizadoras de fosfatos

Cepas	Forma	Borde	Aspecto	Color
Z1	Circular	Entero	Cremosa	Crema
Z2	Circular	Entero	Cremosa	Crema
Z3	Circular	Entero	Cremosa	Crema
Z4	Circular	Entero	Cremosa	Amarillo claro

Presencia de pigmentos fluorescentes en medio de King B (KB)

La prueba se realizó en las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 utilizando el medio KB (King *et al.*1954). La presencia de *Pseudomonas* se descartó ya que ninguna de las cepas presento pigmentación fluorescente.

Producción de ácidos orgánicos

Los resultados obtenidos en la producción de ácidos orgánicos, las bacterias acidificaron el medio de cultivo (Figura 13) por lo que se puede afirmar que la

solubilización de fosfatos se lleva a cabo mediante un mecanismo que involucra la producción de ácidos orgánicos; y concuerda con lo mencionado por Badia (2011), que en varios estudios de laboratorio, demostró que la solubilización de fosfatos se debe principalmente a la excreción de ácidos orgánicos, que a su vez, son los responsables de la disminución del pH del medio. Rashid *et al.*, (2004) mencionan que la presencia de los ácidos orgánicos causa un descenso de pH aproximadamente a 2.

Muleta *et al.*, (2013), mencionan que todas las bacterias Gram negativas tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos, lo que explica la mayor capacidad de solubilización de P de estas bacterias.

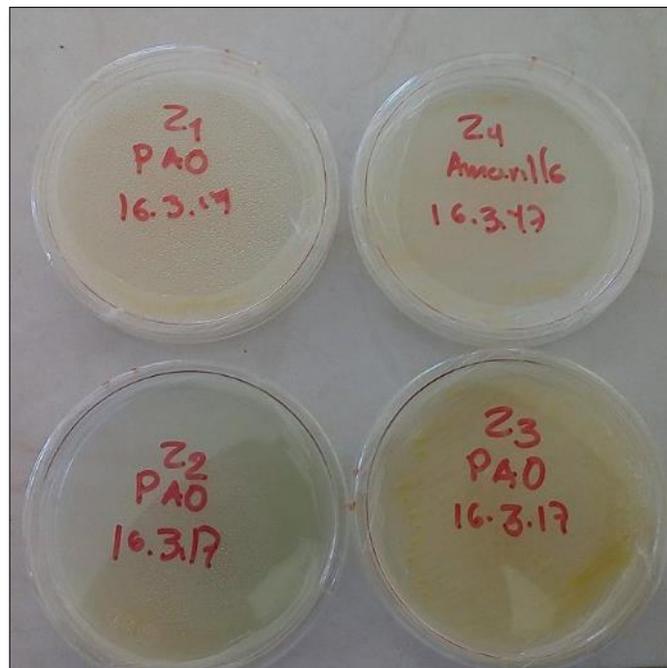


Figura 13. Cambio de pH en medio NBRIP- ABT

Evaluación del efecto solubilizador de bacterias *in vitro*

Para propósitos experimentales se realizó la modificación del medio (Cuadro 7) contiene fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) que constituye la fuente inorgánica de fósforo, glucosa como fuente de carbono, azul de bromotimol como indicador de pH, sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$) y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, cloruro de potasio (KCl) para regular la presión osmótica y otros

componentes como sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) para cofactores enzimáticos además de incrementar la tasa metabólica de los microorganismos.

Cuadro 7. Composición del medio NBRIP modificado

Componentes	g/L
Dextrosa	10
$(NH_4)_2 SO_4$	0.15
KCl	0.2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25
$Ca_3 (PO_4)_2$	3
Agar	20
pH	6.8

Fuente: Nautiyal, 1999

pH

Kim *et al.*, (1998) determinaron una fuerte relación entre la caída del pH y un aumento drástico de la concentración del fosfato solubilizado. En este trabajo existe una alta relación entre el pH y la cantidad de fósforo disuelto. El pH fue elemental para el establecimiento del experimento. Las cepas seleccionadas crecieron en un pH de 6.8 tal como se muestra en el Cuadro 8 y estudios realizados por Lara *et al.*, (2011), mencionan que se requiere de un pH no mayor a 7 hasta valores aproximados a 2 dado que es el pH principal mecanismo por el cual los compuestos fosfatados son solubilizados por las bacterias.

Cuadro 8. Solubilización del medio NBRIP en base al pH

Tratamientos	pH					
	6.0	6.5	6.8	7.0	7.2	7.5
Z1	-	-	X	-	-	-
Z2	-	-	X	-	-	-
Z3	-	-	X	-	-	-
Z4	-	X	X	X	X	-

Bases para la selección de pH para el crecimiento de las bacterias

Efecto de las bacterias seleccionadas en el crecimiento y desarrollo de plántulas de tomatillo (*Physalis ixocarpa*)

Después de tres meses del establecimiento del cultivo de tomatillo, se evaluaron los datos, de la aplicación de las BSP a través de un diseño experimental completamente al azar y según el análisis de varianza y prueba de Tukey, se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos para el peso fresco, número de flores y número de ramas, excepto en el diámetro del tallo, como se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Efecto de la inoculación con las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 en el crecimiento y desarrollo de plantas de Tomatillo (*Physalis ixocarpa*)

Tratamientos	Peso fresco (g)	Diámetro del tallo (mm)	Número de Flores	Número de Ramas
Control absoluto	129.80 b	8.21a	42.60 b	3.30 b
T1	140.60 b	8.58 a	67.90 ab	4.80 ab
T2	251.80 ab	10.30 a	126.40 a	5.20 a
T3	312.10 a	9.41 a	124 a	4.20 ab
T4	209.20 ab	10.36 a	127 a	4.20 ab

^{a,b} Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes, con una probabilidad de 5 %, según la prueba de Tukey, a partir de un diseño completamente al azar. T0: control absoluto T1: *Chloris submutica* ^(Z1) T2: *Deschampsia cespitosa* ^(Z2) T3: *Chloris virgata* ^(Z3) T4: *Setaria adhaerens* ^(Z4) de *Physalis ixocarpa*

Peso fresco de la planta de tomatillo

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento 3 presento diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) sobre peso fresco en comparación con el testigo, (Cuadro 10), resultados que concuerdan con los obtenidos por Fan *et al.*, (2011) en diferentes variedades de maíz. Lo anterior es comparado con la investigación llevada a cabo por García *et al.*, (2015), donde observaron que con el aislamiento de *Pseudomonas* spp. se obtuvieron mayor longitud, peso fresco y seco del tallo en comparación con tratamiento control sin inocular, resultados que concuerdan con los de Santillana (2006) en frijol y maíz, mostrando

aumentos de rendimiento en grano que fueron similares a los producidos por la aplicación de fósforo, en ambos casos se mostró un efecto promotor del crecimiento vegetal producido por esta bacteria. Adicionalmente, Barreto *et al.*, (2007), Farina *et al.*, (2012), Yu *et al.*, (2012) y Dash *et al.*, (2013), señalan que los resultados positivos sobre el crecimiento de las raíces y el aumento del peso seco de tallos y raíces de las plántulas, pueden ser debidos a la habilidad de las cepas bacterianas para solubilizar fosfatos.

Cuadro 10. Efecto de la inoculación con las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 sobre el peso fresco de *Physalis ixocarpa*

Tratamientos	Nombre	Peso fresco
T0	Control absoluto	129.80 b
T1	Z1 <i>Chloris submutica</i>	140.60 b
T2	Z2 <i>Deschampsia cespitosa</i>	251.80 ab
T3	Z3 <i>Chloris virgata</i>	312.10 a
T4	Z4 <i>Setaria adhaerens</i>	209.20 ab

^{a,b}Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes, con una probabilidad de 5 %, según la prueba de Tukey, a partir de un diseño completamente al azar.

El peso fresco presento valores altos en los tratamientos 2 y 3. Estos tratamientos tuvieron un incremento de hasta el 140.44% siendo la cepa Z3 quien mostro este resultado, seguido del tratamiento 2 que corresponde a la cepa Z2 con un 93.99% comparados con el control absoluto sin inocular. Se evidenciaron valores más pequeños en el tratamiento 1 con la cepa Z1 y el tratamiento 4 con la cepa Z4 como se puede observar en la Figura 14.

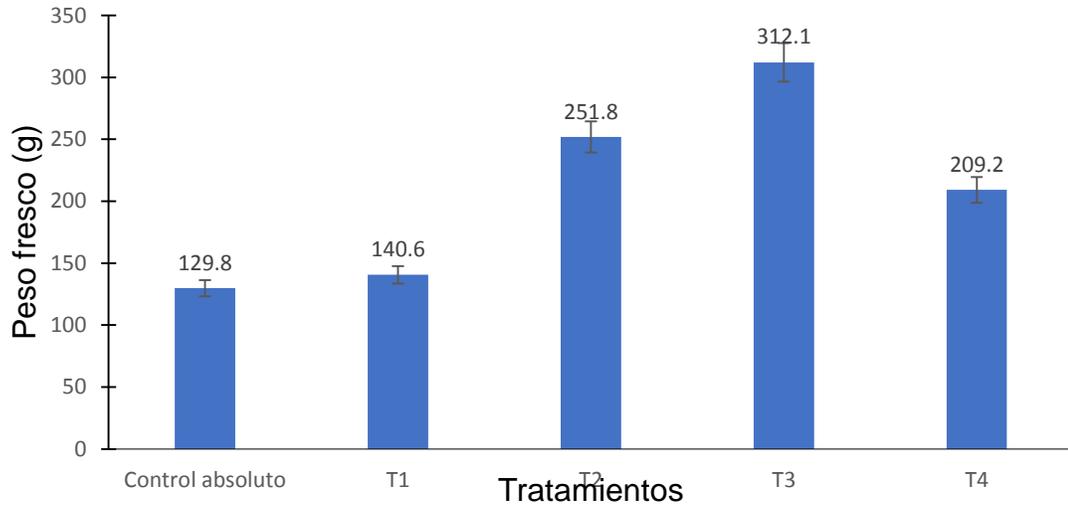


Figura 14. Efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el peso fresco T0: control absoluto T1: *Chloris submutica* ^(Z1) T2: *Deschampsia cespitosa* ^(Z2) T3: *Chloris virgata* ^(Z3) T4: *Setaria adhaerens* ^(Z4)

Diámetro del tallo

Con respecto al diámetro del tallo (Cuadro 11) los tratamientos inoculados con las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 no mostraron diferencias sobre el testigo sin inocular, en coincidencia con estudios realizados por Collavino *et al.*, (2010) en el cultivo de frijol ya que no encontraron efectos sobre el peso del tallo, o sobre el tamaño del área foliar. Dato contradictorio a lo mencionado por Martínez *et al.*, (2013), con las cepas MA06 y MA12 que aumentaron de manera significativa ($P \leq 0.05$) el diámetro del tallo, peso fresco y seco del vástago, lo que se reflejó en aumentos de biomasa de 17.0 y 20.0 % en tallo y vástago, respectivamente.

Cuadro 11. Efecto de la inoculación con las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 sobre el diámetro del tallo de *Physalis ixocarpa*

Tratamientos	Nombre	Diámetro del tallo (mm)
T0	Control absoluto	8.21 a
T1	Z1 <i>Chloris submutica</i>	8.58 a
T2	Z2 <i>Deschampsia cespitosa</i>	10.30 a
T3	Z3 <i>Chloris virgata</i>	9.41 a
T4	Z4 <i>Setaria adhaerens</i>	10.36 a

^{a,b}Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes, con una probabilidad de 5 %, según la prueba de Tukey, a partir de un diseño completamente al azar.

Según los resultados obtenidos en el diámetro del tallo, estadísticamente no hubo diferencias ($P \leq 0.05$) pero numéricamente el tratamiento 4 con la cepa Z4, tuvo un incremento del 26.18% y el tratamiento 2 con la cepa Z2 tuvo un incremento del 25.45% en comparación con el control absoluto sin inocular. (Figura 15)

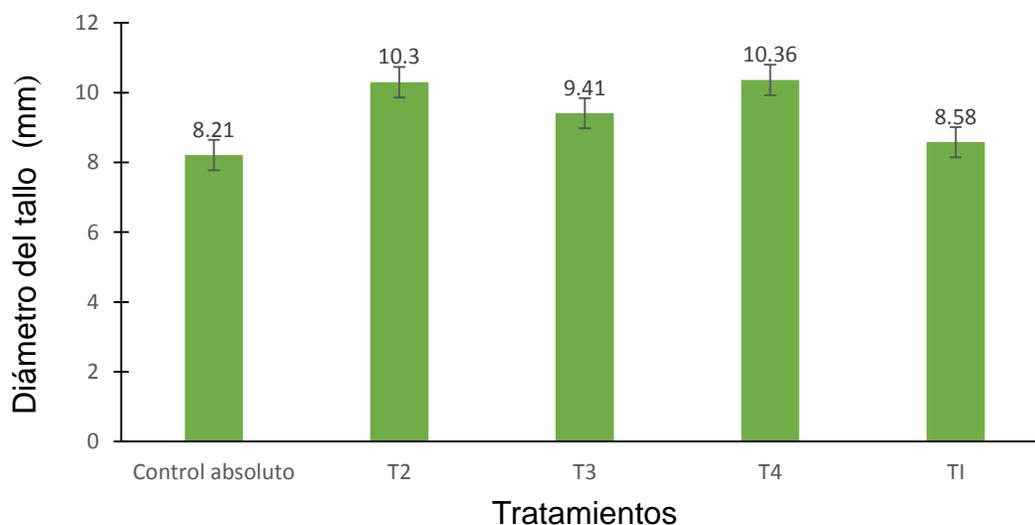


Figura 15. Efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el diámetro del tallo T0 control absoluto T1 *Chloris submutica* ^(Z1) T2 *Deschampsia cespitosa* ^(Z2) T3 *Chloris virgata* ^(Z3) T4 *Setaria adhaerens* ^(Z4) de *Physalis ixocarpa*

Número de flores

Al realizar el análisis estadístico y prueba de Tukey (Cuadro 12).para el parámetro número de flores, el tratamiento 4 fue notoriamente superior, al presentar un promedio de 127 flores seguido del tratamiento 2, con 126.4 flores y el tratamiento 3 con 124 flores, los resultados presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en comparación con el tratamiento 1 que tuvo 67.90 flores y siendo el testigo el que presento menor número de flores, con un promedio de 42.60 unidades. Lo anterior es comparado con la investigación llevada a cabo por Madigan *et al.*, (2003), donde observo, que con la inoculación de BSF influye positivamente en la formación de botones que dará como resultados abertura de flores

Cuadro 12. Efecto de la inoculación con las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 sobre el número de flores de *Physalis ixocarpa*

Tratamientos	Nombre	Numero de flores
T0	Control absoluto	42.60 b
T1	Z1 <i>Chloris submutica</i>	67.90 ab
T2	Z2 <i>Deschampsia cespitosa</i>	126.4 a
T3	Z3 <i>Chloris virgata</i>	124 a
T4	Z4 <i>Setaria adhaerens</i>	127 a

^{a,b}Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes, con una probabilidad de 5 %, según la prueba de Tukey, a partir de un diseño completamente al azar.

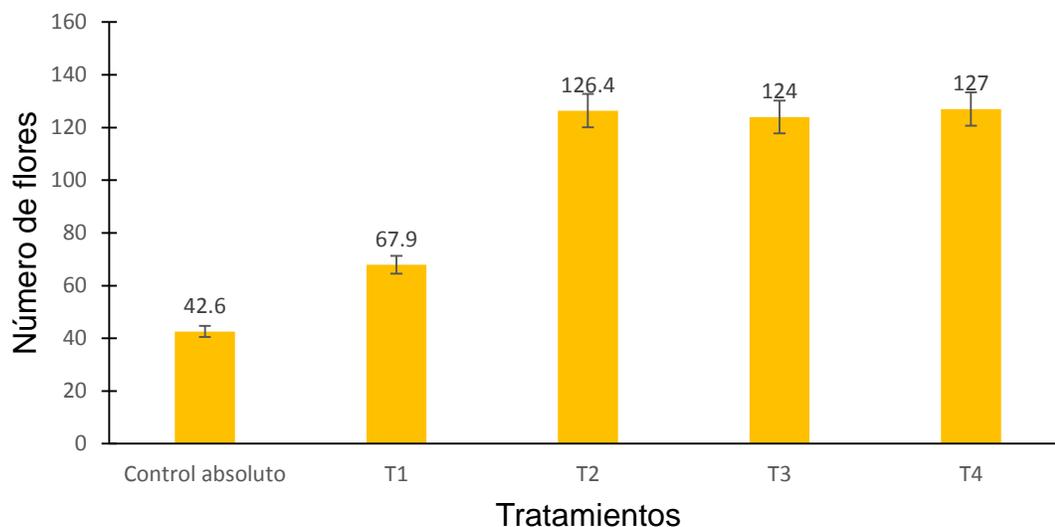


Figura 16. Efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el número de flores T0: control absoluto T1: *Chloris submutica* ^(Z1) T2: *Deschampsia cespitosa* ^(Z2) T3: *Chloris virgata* ^(Z3) T4: *Setaria adhaerens* ^(Z4) de *Physalis ixocarpa*

En el número de flores (Figura 16) el tratamiento 4 que corresponde a la cepa Z4, presentó los valores más altos, con un incremento del 198.12% seguido del tratamiento 2 cepa Z2, con un incremento de 196.71% y del tratamiento 3 cepa Z3 con un incremento del 191.07% en comparación con el testigo, Se evidenciaron valores más pequeños en el tratamiento 1 con la cepa Z1.

Número de ramas

En cuanto al número de ramas, según el análisis estadístico y prueba de Tukey no hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Los tratamientos 1 y 2 respondieron igual y los tratamientos 3 y 4 respectivamente. (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto de la inoculación con las cepas Z1, Z2, Z3 Y Z4 sobre el número de ramas de *Physalis ixocarpa*

Tratamientos	Nombre	Número de ramas
T0	Control absoluto	3.30 b
T1	Z1 <i>Chloris submutica</i>	4.80 ab
T2	Z2 <i>Deschampsia cespitosa</i>	4.80 ab
T3	Z3 <i>Chloris virgata</i>	4.20 ab
T4	Z4 <i>Setaria adhaerens</i>	4.20 ab

^{a,b}Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes, con una probabilidad de 5 %, según la prueba de Tukey, a partir de un diseño completamente al azar.

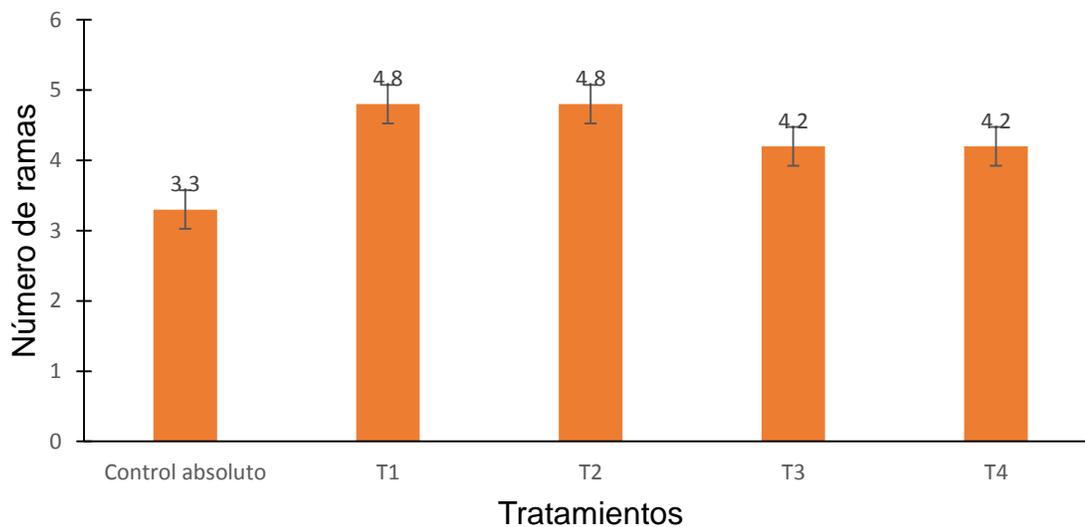


Figura 17. Efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el número de ramas T0: control absoluto T1: *Chloris submutica* ^(Z1) T2: *Deschampsia cespitosa* ^(Z2) T3: *Chloris virgata* ^(Z3) T4: *Setaria adhaerens* ^(Z4) de *Physalis ixocarpa*

En cuanto al número de ramas no hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) pero numéricamente el tratamiento 2 mostro un incremento del 57% seguido del tratamiento 1, que mostro un incremento del 45%, en comparación con el testigo. Los tratamientos 3 y 4 tuvieron un ligero incremento del 27%.

En cuanto al crecimiento de las plántulas, se encontró que a los tres meses de haberse iniciado el ensayo, cada una de las cepas tuvo un efecto positivo en al menos una de los parámetros evaluados. Las cepas Z2 y Z3 aumentaron de

manera significativa ($p \leq 0.05$) el peso fresco de la planta, con un incremento de hasta el 140.44% en comparación con el testigo, lo que reflejó aumentos en la biomasa. Las cepas Z2, Z3 y Z4 aumentaron el número de flores en comparación con el control absoluto y tuvieron un incremento hasta del 198.12 % respectivamente. La cepa Z2 mostro un incremento en el número de ramas seguido de la cepa Z3 y Z4. Los resultados obtenidos en el diámetro del tallo no mostraron diferencias estadísticamente significativas pero numéricamente hubo un incremento del 26.18% por parte de la cepa Z4 seguido de la cepa Z2 con un 25.45%.

Bashan *et al.* (2013) plantearon una hipótesis para el aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fosfatos que promueven el crecimiento de las plantas, en la que señalan que: i) el fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como factor universal para el aislamiento y evaluación de BSF, no es un buen selector, ya que existen discordancias cuando se seleccionan bacterias usando este compuesto y se inoculan plantas; ii) Se debería reemplazar el uso de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ por una combinación de dos o tres compuestos metal-P, como factor inicial de selección; iii) La selección de candidatos metal-P para potenciales BSP dependerá del tipo de suelo (alcalino, ácido o rico en materia orgánica) donde las BSF serán usadas, por lo que se sugiere la adición de compuestos Ca-P (incluyendo roca fosfórica) para suelos alcalinos, compuestos Fe-P y Al-P para suelos ácidos, y fitatos para suelos ricos en Po; iv) la producción de un halo en agar sólido no debería ser considerada la única prueba para la solubilización de fósforo y cuando las colonias crecen sin un halo después de varios repiques en el medio, debería llevarse a cabo una prueba adicional en medio líquido para medir la disolución de P.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en las que se desarrolló este trabajo podemos concluir lo siguiente:

Se aislaron 4 cepas solubilizadoras de fosfatos, todos los aislamientos presentaron forma bacilar con tinción Gram negativa. Se identificaron como Z1, Z2, Z3 y Z4, y presentaron colonias circulares, formaron halos de solubilización a partir de fosfato tricálcico en medio de cultivo NBRIP, Su principal mecanismos de acción incluyen la producción de ácidos orgánicos, asimilación directa de fosfatos insolubles a partir de la disminución del pH de medio, las cepas no presentaron antagonismo, y se probaron como biofertilizantes en el cultivo de tomatillo, desempeñaron un papel fundamental en la nutrición de las plantas, como peso fresco, incremento de flores y diámetro del tallo, indirectamente coincidimos que fue posible debido a la presencia bioinoculantes con base BSF.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander**, M. 1987. Introduction of soil microbiology. New York, USA. pp 448.
- Arai**, Y., Sparks D. 2007. Phosphate reaction dynamics in soils and soil components: a multiscale approach. *Adv. Agron.* 94: 135-179.
- Arzuaga**, S., Fernández, C., Dularzo, H., Vázquez, D. 2005. Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa acida, en entisoles, alfisoles y vertisoles de corrientes con diferentes usos agrícolas. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina. PP 4.
- Badia**, M. 2011. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Bras. Ecol.* 6(1): 90-99.
- Banerjee**, S., Palit, R., Sengupta, C., Standing, D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Aust. J. Crop Sci.* 4 (6): 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.* 69: 353-364.
- Barreto**, D., Valero, N., Muñoz, A., Peralta, A. 2007. Efecto de microorganismos rizosférico sobre germinación y crecimiento temprano de *Anacardium excelsum*. *Zonas Áridas.* 11(1):240-250.
- Bashan**, Y., Kamnev, A., De-Bashan, L. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol. Fertil. Soils.* 49: 465-79.
- Berc**, J., Muñoz, O., Calero, B. 2004. Vermiculture offers a new agricultural paradigm. *Biocycle.* 45 (6): 56-7.

- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, A., Ulrich, A., Hallmann, J.** 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 5:215-229.
- Bobadilla, C., Rincón 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. Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Caballero, J., Onofre, J., Estrada, P., Martínez, L.** 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *App. and Envirom. Microbiol.* 73 (16): 5308-19.
- Calderon, C., Alatorre, F., Simpson, J., Herrera, L.** 2009. Maize under phosphate limitation. In: J.L. Bennetzen and S.C. Hake (eds.). *Handbook of Maize: Its Biology.* Pp. 381-404.
- Chakraborty, B., Chakraborty, U., Sha, A., Sunar, K., Dey, P.** 2010. Evaluation of phosphate solubilizers from soils of North bengaland their diversity analysis. *World J. Agricul. Sci.* 6(2):195-200.
- Chen, Y., Rekha, P., Arun, A., Shen, F.** 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil. Ecol.* 34: 31-41.
- Christy, M. Ramalingam R.** 2005. Vermicomposting of sago- industrial solid waste using an epigeic earthworm *Eudrilus eugeniae* and macronutrients analysis of vermicompost. *Asian J Microb Biotechnol. Environ. Sci.*7 (3): 377-81.
- Chuang, C., Kuo, Y., Chao, C., Chao, W.** 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growt promotion by *Aspergillus niger*. In: *Biol.Fert. Soil.*43: 575-584.

- Collavino**, M., Sansberro, P., Mroginski, L., Aguilar, M. 2010. Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate- solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol. Fert. Soil.* 46 (7): 727-738.
- Cordell**, D., Drangert, J., White, S. 2009. The Story of Phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change.* Pp 292-305.
- Das**, K., Katiyar, V., Goel, R. 2003. Solubilization potential of plant growth promoting *Pseudomonas mutants* at low temperature. *Microbiol. Res.* 158: 359-362.
- Dash**, S., Kumar, A., Gupta, N. 2013. Growth response of *Dalbergia sissoo* Roxb. to mineral solubilizing bacteria and fungi in nursery conditions. *Trop Ecol.* 54(1):109-115.
- De Freitas**, J., Banerjee, M., Germida, J. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola *Brassica napus* L. *Biol. Fert. Soil.* 24: 358–364.
- Fan**, B., Chen, H., Budihario, A., Bleiss, W., Vater, J. Borris, R. 2011. Efficient colonization of plant growth promoting bacterium *Bacillus amiloliquefaciens*. Engineered to express green fluorescent protein. *J. Biotechnol.* 151: 303-311.
- Fankem**, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, W., Merbach, W. 2006. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *Afri. J. Biotechnol.* 5 (24): 2450-2460.
- FAO**. 2002. Informe sobre agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Italy, Rome. 241 pp.
- FAO**. 2005. Tendencias mundiales actuales y perspectivas de los fertilizantes (en línea). Italia. Consultado 26 abr. 2017. Disponible en <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/cwfto09s.pdf>

- Farina, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Campos, S., Brito, B., Wendisch, V.** 2012. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *Appl. Soil. Ecol.*55:44-52.
- Fundación Produce Puebla A.C.** 2007. Programa Estratégico de Necesidades de Investigación y Transferencia de Tecnología en la Cadena Productiva de Tomate Verde en el Estado de Puebla.
- Fundación Produce Sinaloa A.C.** 2007. Diagnóstico de la Cadena de Tomatillo: Estudio de las Necesidades Estratégicas de Investigación, Validación y Tránsito de Tecnología en el Estado de Sinaloa.
- García, R. Lovaisa, A., 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). *Rev. Agron. Nor. Arg.* 35(1):13-28.
- Glick, B.** 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
- Gómez, Y., Zabala, M.** 2001. Determinación de la capacidad solubilizadora del P en hongos aislados de la rizósfera del maní (*Arachis hypogaea* L.) *Saber. Universidad de Oriente, Venezuela* 13(1):8-13.
- Grassano, A., Ronchi, A., García, P., López, M.** 2003. Acción de bacterias solubilizadoras de fósforo sobre la simbiosis rizobio-leguminosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de la Pampa. Termas de Río Hondo, Santiago del Estero, Argentina.
- Guang, T., Shu, T., Miao, C., Guan, H.** 2008. Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Phosphor* 18(4): 515-523.
- Guerrero, E.** 1996. Fundamentos biológicos y estado del arte. Micorrizas recurso biológico del suelo. Bogotá Colombia. Pp 346.
- Gupta, M., Rahi, P., Phatania, V., Gulati, A., Singh, B., Kumar, R.** 2010. Stimulatory effect of phosphates solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and

- rebaudioside. A contents of *Stevia (rebaudina* Bertoni). Appl. Soil. Ecol. 46(2): 222-229.
- Gyaneshwar**, P., Naresh, G., Kumar, L., Parekh, J. Poole P. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil. 245: 83–93.
- Hameeda**, B., Harini, G., Rupela, O., Wani, S. Gopal R. 2008. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiol. Res. 163:234-242.
- Han**, S., Supanjani, S., Lee, Kyung. 2006. Effect of coinoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. In: Plant. Soil. Environ. (52): 130-136.
- Hanke**, F. 2005. Microbiología del suelo. en: memorias seminario microbiología y bioquímica de los abonos orgánicos fermentados suelo y rumen. Fundación Universitaria Juan de Castellanos. Tunja, Colombia. Pp 13 -23.
- Hewitson**, J., Price, R. 1994. Plant mineral nutrition in the classroom. School Sci. Rev. 76 (274), 45-55.
- Holford**, I. 1983. Differences in the efficiency of various soil phosphate tests for white clover between very acidic and more alkaline soils. Aust. J. Soil. Res. 21: 173-182.
- Hyland**, C., Ketterings, Q., Dewing, D., Stockin, R., Czymmek, K., Albrecht, G., Geohring, L. 2005. Phosphorus basics. The phosphorus cycle, Cornell University; Cornell. Agronomy Fact Sheet. 12 pp.
- Ivanova**, R., Bojinova, D., Nedialkova, K. 2006. Rock phosphate solubilizing by soil bacteria. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy 41 (3): 297-302.
- Karpagam**, T., Nagalakshmi, P. 2014. Isolation and characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Agricultural soil. I. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 3 (3): 601-614.

- Kaur, G.** 2014. Influence of p-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocational sites. *Eur. J. soil. Biol.* 61: 35-40.
- Kim, K., Jordan, D., McDonald G.** 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soil.* 26: 79-87.
- King, E., Ward, M., Raney, D.** 1954. Dos medios simples para la demostración de piocianina y fluoresceína. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- Kögel, I.** 2006. Chemical structure of organic N and organic P in soil. In: P. Nannipieri and K. Smalla (Eds.). *Nucleic Acids and Proteins in Soil.* Springer Verlag, Berlin. 23-48 pp.
- Kucey, R.** 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and Virgin Alberta soils. *Can. J. Soil. Sci.* 63: 671-678.
- Lara, C., Esquivel, L, Negrete, J.** 2011. Bacterias nativas solubilizadoras de fosfato para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba, Colombia. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial.* 9 (2): 114-120.
- Leaungvutiviroj, C., Ruangphisarn, P., Hansanimitkul, P., Shinkawa, H., Sasaki, K.** 2010. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N₂ fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. In: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(5): 1098-1101.
- Maathuis, F.** 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant. Sci.* 12: 250-258.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J.** 2003. *Brock Biología de los Microorganismos.* 10 ma edición. Editorial Prentice Hall. Madrid, España.
- Martínez, L., Martínez, R., Hernández, M., Arvizu, S., Pacheco, J.** 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Rev. Fitotec. Mex.* 36(1): 63-69.

- Martínez, P.,** García, D. 2010. Bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales altoandinas Colombianas *Weinmannia tomentosa* y *Escalonia myrtilloides*. Rev. Intropica. 5(1):63-76.
- Mejía, G.**1995. Agricultura para la vida: movimientos alternativos frente a la agricultura química. Rev. Colomb. Biote. Cali, Colombia 7 (2) 47-88.
- Mikanova, O.,** Novakova, J. 2002. Evaluation of the p-solubilizing activity of soil microorganism and its sensivity to soluble phosphate. Rostl. Vým. 48(2): 397-400.
- Mohammed, M.,** Pan, W., Kennedy, A. 1998. Seasonal mycorrhizal colonization of winter wheat and its effect on wheat growth under drylan conditions. Mycorrhiza 8 (3): 139-144.
- Molano, A.** 2004. Aislamiento de bacterias biofertilizantes (*Nitrobacter* spp. *Rhizobium* spp., *Azospirillum* spp.). para un sistema de compost tipo windrow. Revista Umbral Científico. (5):25- 32.
- Muleta, D.,** Assefa, F., Borjesson, E., Granhall U. 2013. Phosphate solubilizing bacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. J. Saudi. Soc. Agric. Sci.12 (1): 73-84.
- Nautiyal, C.** 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. FEMS. Microbiol. Lett.170 (1):265-70.
- Navarro, S.,** Navarro, G. 2003. Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal, Editorial Mundi Prensas, 2^{da} Edición. Pp 487
- Niklitschek, M.** 2008. Evaluación del rendimiento del trigo (*Triticum aestivum*), inoculado con bacterias solubilizadoras de fósforo y una cepa fijadora de nitrógeno, aisladas de la rizósfera de especies arbustivas. Facultad de Ciencia Agrarias. Universidad Austral de Chile. Tesis de licenciatura. Valdivia, Chile. 78 pp.

- Oberson, A., Friesen, D., Rao, I., Bühler, S., Frossard, E.** 2001. Phosphorus transformations in an oxisol under contrasting land-use systems: The role of the microbial biomass. *Plant. Soil.* (237):197-210.
- Olsen, S. Watanabe, F.** 1957. A method to determine a phosphorus absorption maximum of soils as measured by the Langmuir isotherm. *Soil. Sci. Am. J.* 21: 144-149.
- Orozco, M.** 2006. Fomento de la agricultura sostenible mediante el establecimiento de un sistema de garantías de calidad en los procesos productivos y de comunicación a los consumidores.
- Otalora, J., Patiño, L., Martínez, M., Pedroza, A.** 2003. Estandarización de una técnica cualitativa de producción de fosfatasas producidas a través de microorganismos solubilizadores de fosfato. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Patiño, C.** 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia. Tesis doctoral en Ciencias Agropecuarias-Manejo de Suelos y Aguas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Palmira, Colombia.
- Pedraza, R.** 2008. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 125:25-35.
- Pérez, .**2014. Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. *Am. J. Agron.* 25 (2):213-223.
- Pérez, A., De la Ossa, J., Montes, D.** 2012. Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del departamento de Sucre. *Rev. Colomb. Cienc. Anim.* 4(1):35-45.
- Pérez, C., Rojas, S. y Fuente C.** 2010. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Revista Acta Biológica Colombiana* 15:1-18.

- 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 región. *Soil. Biol .biochem.* 39: 2905-2914.
- Picone, L., Zamuner, E.** 2002. Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *Informaciones agronómicas del cono sur* 16: 11-15.
- Prada, L.** 2013. Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los Andes Orientales Colombianos. Tesis, Posgrado De Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Prasad, R. Power J.** 1997. Phosphorus. In: R. Prasad and J. Power. *Soil fertility management for sustainable agriculture.* CRC Press LLC, Boca Raton Florida. 171-209 pp.
- Raghothama, K., Karthikeyan, A.** 2005. *Plant and soil.* 274:1-2.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., Latif, F.** 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganism (PSM) under in vitro conditions. *Pak. J. Biol. Sci.* 7 (2): 187-196.
- Rodas, A.** 2006. La agricultura y microorganismos. *Revista Engormix.* 13-27.
- Rodríguez, H., Fraga, R.** 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Research review paper. Biotechnol. Adv.* 17: 319-339.
- Rodríguez, J., Pinochet, D., Matus, F.** 2001. *Fertilización de los cultivos.* Santiago, Chile, Editorial LOM. Pp 117.
- Rooney, D., Clipson, N.** 2009. Phosphate addition and plant species alters microbial community structure in acidic upland grassland soil. *Microb. Ecol.* 57: 4-13.
- Rosas, S., Rovera, M., Correa, J.** 2006. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia–legume symbiosis. *Soil. Biol. Biochem.* 38: 3502–3505.

- Rossi, M.** 2011. Adsorción y desorción de fósforo en suelos del área central de la región Pampeana. Tesis, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 160 pp.
- Salazar, J.** 2005. El fósforo en los sistemas granaderos de leche. *Agronomía Mesoamericana*. 18: 231-238.
- Sánchez, A.** 2007. Phosphorus. In: Barker, A. V. and Pilbean, D. J. (Editors). *Manual of plant nutrition*. 51-90 pp.
- Sánchez, L., Gómez, R., Garrido, M.** 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3 (7): 1401-15.
- Santillana, N.** (2006). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* spp. *Ecología Aplicada*. 5: 1-2.
- Schaad, w., Jones, J., Chun, W.** 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Minnesota. U S. Am. Phytopathological Soc. 175-199.
- Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U y Wilhelm. E.** 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytic in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39:23-32.
- SIAP.** 2012. Información de las Delegaciones de la SAGARPA. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.siap.gob.mx.
- SIAP.** 2014. Información de las Delegaciones de la SAGARPA. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. www.siap.gob.mx.

- Supanjani, S., Hio, S., Jung, J and Lee, Kiung.** 2006. Rock phosphate potassium and rock- solubilizing bacteria as alternative, sustainable fertilizers. *Agron. Sustain. Dev.* 26: (4) 233-240.
- Tarafdar, J., Rao, A., Bala, K.** 1988. Production of phosphatase by fungi isolated from desert soils. *Folia. Microbiol.* 33: 453-457.
- Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Botina, S., Netrusov, A.** 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res.* 162:69-76.
- Vaccari, D.** 2009. La crisis del fósforo. *Investigación y Ciencia*, edición española de Scientific American. España 395:22-27.
- Valero, N.** 2003. Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfato asociadas al cultivo de arroz (*Oriza sativa*). Tesis de Maestría en Ciencias Microbiología. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Bogotá, Colombia.
- Vargas, J.** 2012. Microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos. Monografía de Grado de Química Ambiental. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Wakelin, S., Warren R., Harvey, P., Ryder, M.** 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat root. In: *Biol. Fert. Soil.* 40: 36-43.
- White, P., Hammond, J.** 2008. Phosphorus nutrition of terrestrial plants. The ecophysiology of plant- phosphorus interactions, rev. Springer Netherlands (7) 51-81.
- Whitelaw, M.** 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69: 99-151.
- Yu, X., Liu, X., Zhu, Th., Liu, G., Mao, C.** 2012. Coinoculation with phosphate solubilizing and nitrogen fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *Eur. J. Soil. Biol.* 50: 112-117.