

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



BACTERIAS RELICTAS SUPRESORAS DE SÍNTOMAS DE DEFICIENCIA DE  
FÓSFORO EN PLANTAS.

TESIS

Que presenta ITANDEHUI JUANITA ERENDIRA ESPARZA ARREDONDO

Como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Julio 2020

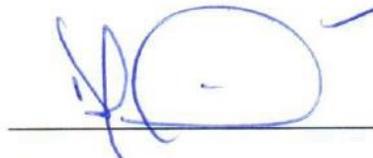
BACTERIAS RELICTAS SUPRESORAS DE SÍNTOMAS DE DEFICIENCIA DE  
FÓSFORO EN PLANTAS.

Tesis

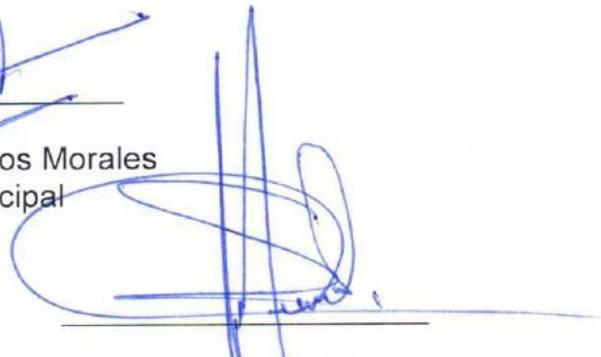
Elaborada por ITANDEHUI JUANITA ERENDIRA ESPARZA ARREDONDO  
como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias en  
Parasitología Agrícola con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Asesor Principal



Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo  
Asesor



Dr. Melchor Cepeda Siller  
Asesor



Dr. Ismael Cabral Cordero  
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente  
Subdirector de Postgrado  
UAAAN

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y a todo su personal**, por brindar el apoyo y herramientas durante mi formación académica.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo brindado para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Parasitología Agrícola.

Al **Dr. Gabriel Gallegos Morales**, gracias por su disposición, amabilidad, críticas, dedicación y por permitirme colaborar en este trabajo de investigación. Además, de concederme valiosas bases para la investigación científica, por su tiempo, apoyo durante toda la maestría.

Al **Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo** gracias por su disposición, amabilidad, exigencia, dedicación en el camino de mi preparación del grado.

Al **Dr. Melchor Cepeda Siller** gracias por su dedicación, disponibilidad, comentarios y aportaciones a este proyecto.

AL **Dr. Ismael Cabral Cordero** gracias por sus valiosos comentarios, opiniones y su tiempo.

A la **Dr. Ileana Vera Reyes** gracias por su apoyo y por todo lo que me ha enseñado desde que me dio la oportunidad de trabajar con usted.

A **Blanca Estela Mares Fermín** Gracias por ser una maravillosa persona, por su apoyo y servicio que fue de vital importancia para este proyecto.

A **Zulema Piedra Aguirre** gracias por tu inmensurable apoyo lo largo del posgrado, que es de vital importancia para cada uno de los estudiantes de posgrado.

A cada uno de los investigadores por compartir su paciencia y conocimiento.

## DEDICATORIA

Muchas personas han contribuido indirectamente o directamente en este proyecto, con quienes estaré enormemente agradecida y a quien con amor les dedico cada uno de mis logros. Gracias por creer en mí.

Empezando por esas personas que en la actualidad, ya no están con nosotros pero que aun en su ausencia seguimos aprendiendo de ellos. A aquellas personas que la vida ha puesto en nuestro camino, que siempre estarán cuando los necesites y que conforman parte de ese enorme rompecabezas que es la vida.

Este trabajo va dedicado a **Jorge Esparza de la Cruz, Imelda Arredondo Rivera y Donaji Esparza Arredondo** no pude tener una mejor familia. Gracias por su amor, apoyo, enseñanzas y por todo lo que me han dado en esta vida.

A **Víctor Rivero Hernández**, gracias por ser la persona que la vida a puesto en mi camino para iluminar mis días malos, amarme, apoyarme, cuidarme, comprenderme y estar siempre para mí.

A la **Ing. Alexandra Deyanira Martínez Ruiz y Dra. Marianela Hazel Álvarez Hernández** quienes además de ser inteligentes y admirables mujeres, son mis mejores amigas.

Al **Ing. Adan silva Erguía**, gracias por escucharme, aconsejarme y ser mi mejor amigo.

A **Bertha Alicia Estrada Herrera** por ser mi consejera, amiga y segunda madre. Gracias infinitas por todo lo que has hecho por mí desde el día en que te conocí.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<i>LISTA DE CUADROS</i> .....	<i>VI</i>
<i>LISTA DE TABLAS</i> .....	<i>VII</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i> .....	<i>VIII</i>
<i>LISTA DE GRAFICAS</i> .....	<i>IX</i>
<i>RESUMEN</i> .....	<i>X</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	<i>1</i>
1.1 Objetivo general.....	2
1.1.1 Objetivos específicos .....	2
1.2 Hipótesis .....	2
<i>REVISIÓN DE LITERATURA</i> .....	<i>3</i>
2.1.- El fósforo.....	3
2.2.- El fósforo en el suelo .....	3
2.3.- Fertilizantes .....	4
2.4.- La roca fosfórica alrededor del mundo. ....	5
2.5.- El fósforo en México. ....	6
2.6.- Biofertilizantes .....	7
2.8.- Deficiencias de fósforo en plantas .....	8
2.9.- Microorganismos solubilizadores de fósforo (MPS).....	8
2.10.- Procesos microbianos de solubilización de fósforo .....	10
2.11.- Los ácidos orgánicos y la solubilización de fosfatos.....	10

2.12.- Bacterias solubilizadoras de fosfatos.....	11
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> .....	13
3.1.- Aislamiento y purificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) a partir de muestras rizosféricas .....	13
3.2.- Identificación y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo .....	13
3.3.- Pruebas de patogenicidad .....	14
3.3.1.- Pudrición de tubérculo de papa .....	14
3.3.2.- Dihidrólisis de arginina.....	15
3.3.3.- Reacción de hipersensibilidad .....	15
3.4.- Eficiencia de solubilización de fosfatos (ESF) .....	15
3.5.- Cuantificación de solubilización de fosfato inorgánico (IPS).....	16
3.6.- Determinar la síntesis de ácidos orgánicos .....	17
3.7.-Producción de acetoína .....	17
3.8.-Ensayo cualitativo de ácido indol Acético (AIA) .....	17
3.8.1.- Cuantificación de ácido indol acético (AIA).....	18
3.9.- Efecto de BSF en el crecimiento <i>Solanum lycopersicum</i> y <i>Capsicum annuum</i> . .....	18
3.10.- Promoción de la germinación de semillas con inóculos de BSF..	19
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	20
4.1.- Identificación y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF). .....	20
.....	21
4.2.- Patogenicidad de cepas bacterianas .....	22
4.3.- Eficiencia de solubilización de Fosfatos (ESF) .....	23

4.4.- Efecto del pH en la solubilización de fosfato.....	24
4.5.-Efecto de la concentración de $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ sobre la capacidad solubilizadoras de bacterias <i>in vitro</i> .....	25
4.6 Cuantificación de la solubilización de fosfato inorgánico (IPS) .....	27
4.7.- Síntesis de ácidos orgánicos en bacterias solubilizadoras de fosfato. .....	28
4.8.- Cuantificación de ácido indol acético (AIA).....	30
4.9.- Efecto de inoculantes bacterianos en germinación de semillas de <i>Solanum lycopersicum</i> y <i>Capsicum annuum</i> .....	31
4.10.- Efecto BSF en el crecimiento y desarrollo en <i>Solanum lycopersicum</i> y <i>Capsicum annuum</i> .....	33
<i>REFERENCIAS</i> .....	38

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1.** Tipos de fosfatos

**Cuadro 2** Biodiversidad de microorganismos solubilizadores de fosfatos

**Cuadro 3.** Procesos de solubilización de fosfatos.

**Cuadro 4.** Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en bacterias solubilizadoras de fosfatos.

**Cuadro 5.** Comportamiento bioquímico de BSF aisladas de *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Esquema experimental de tratamiento de BSF en *Solanum Lycopersicum* y *Capsicum annum*

**Tabla 2.** Comportamiento bioquímico de BSF aisladas de las gramíneas *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*

**Tabla 3.** Pruebas de patogenicidad de BSF

**Tabla 4.** Eficiencia de solubilización de fosfato de aislados bacterianos de gramíneas *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*

**Tabla 5.** Determinación de la capacidad *in vitro* de solubilización de fosfatos de aislamientos bacterianos presentes en *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*

**Tabla 6.** Síntesis de ácidos orgánicos por bacterias solubilizadoras de fosfato en medio de cultivo BT modificado y Vorges-Proskauer.

**Tabla 7.** Comportamiento de plantas de tomate a la inoculación de BSF bajo cultivo en invernadero.

**Tabla 8.** Comportamiento de plantas de chile a la aplicación de BSF en invernadero.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Depósitos potencialmente económicos de fosfatos en el mundo

**Figura 2.** Clases de rocas y presencia de fosforita en México

**Figura 3.** Coloraciones purpuras en hojas y tallos de tomate

**Figura 4.** Enrollamiento de hojas nuevas en planta de chile

**Figura 5.** Crecimiento colonial y celular de BSF

**Figura 6.** Pruebas de patogenicidad de BSF a) Dihidrolisis de arginina b) Necrosis en tubérculo de papa c) Hipersensibilidad en planta de tabaco.

**Figura 7.** Vista de placa de cultivo para evaluar eficiencia solubilizadora de fosfatos por BSF en medio de cultivo NBRIP.

**Figura 8.** Reacción colorimétrica de exudados de bacterias solubilizadoras de fosfato en la síntesis de sustancias promotoras del crecimiento

**Figura 9.** Plantas de tomate tratadas con BSF en cultivo bajo invernadero.

**Figura 10.** Plantas de chile tratadas con BSF en cultivo bajo invernadero.

## LISTA DE GRAFICAS

**Gráfica 1.** Curva estándar colorimétrica de fosfatos solubles basados en el método de azul de ácido ascórbico.

**Gráfica 2.** Capacidad de solubilización de fosfatos de bacterias aisladas de *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura* en cultivo líquido

**Gráfico 3.** Curva patrón de Ácido Indol Acético con el reactivo de Salkowsky

**Gráfico 4.** Cuantificación de AIA en cultivos de BSF

**Gráfico 5.** Porcentaje de germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* tratadas con BSF.

**Gráfico 6.** Porcentaje de germinación de semillas de *Capsicum annum* tratadas con BSF

## RESUMEN

El fósforo es un elemento esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas al permitir que se desarrollen de manera óptima, mejorar su rendimiento, resistencia a cambios en el medio ambiente y a enfermedades. A pesar de que este macronutriente se encuentra alrededor del mundo, metabólicamente no es asimilable; por lo que es importante su transformación en fósforo soluble a través de microorganismos promotores de crecimiento. Para ello, se planteó aislar, identificar y determinar la capacidad de bacterias solubilizadoras de fosfatos presentes en plantas de *Bromus carinatus* Y *Muhlenbergia macroura* como una alternativa sustentable para proporcionar fósforo soluble a plantas en crecimiento. De muestras de raíces de estos zacates, se lograron aislar y purificar 4 cepas bacterianas en el medio de cultivo NBRID. De estos aislamientos 2 pertenecieron al género *Serratia* y 2 a *Pseudomonas*. Estos aislamientos demostraron capacidad para solubilizar fósforo, producir ácidos orgánicos, acetoina y ácido indol acético, además se observó que su aplicación en plantas de tomate y chile en invernadero promueve el crecimiento vegetativo y el vigor aparente de estos cultivos similarmente al del empleo de fosfato monovalente de potasio tanto en el tallo como en el número de hojas.

**Palabras clave:** Fosfatos, bacterias, promotores de crecimiento, auxinas, ácido indol acético.

## ABSTRACT

RELICTS BACTERIA SUPPRESSORS OF SYMPTOMS OF DEFICIENCY OF PHOSPHORUS IN PLANTS.

BY:

ITANDEHUI JUANITA ERENDIRA ESPARZA ARREDONDO

MASTER IN SCIENCIE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES-ADVISER

Phosphorus is an essential element in the growth and development of plants. By allowing them to develop optimally, improve their performance, resistance to changes in the environment and disease. Although this macronutrient is found around the world, metabolically it is not assimilable; reason why its transformation into soluble phosphorus through growth promoting microorganisms is important. It was proposed to isolate, identify and determine the capacity of phosphate-solubilized bacteria present in *Bromus carinatus* and *Muhlenbergia macroura* plants as a sustainable alternative to provide soluble phosphorus in growing plants. From root samples of these grasses, 4 bacterial strains were isolated and purified in the NBRID culture medium. Of these isolates, 2 belonged to the genus *Serratía*, and 2 to *Pseudomonas*. These isolates demonstrated the ability to solubilize phosphorus, produce organic acids, acetoin, and indole acetic acid, and it is also specified that their application in greenhouse tomato and pepper plants to favor vegetative growth and the apparent vigor of the crop similarly to the use of monovalent potassium phosphate both in the stem and in the number of leaves per plant.

**Key words:** Phosphates, bacteria, growth promoters, auxins, indole acetic acid.

## INTRODUCCIÓN

El fósforo es un nutriente esencial al permitir el desarrollo y crecimiento de las plantas. Interviene en los procesos de metabolismo, fotosíntesis, transferencia de energía, síntesis de ácidos nucleicos, entre otros. Los suelos a pesar de tener un alto contenido de fósforo total, el 98% es insoluble y no útil para la nutrición vegetal. Influye negativamente en la cosecha, la madurez y el desarrollo de la planta. Hoy en día, se ha recurrido a la aplicación de fertilizantes de síntesis química que a pesar de su bajo porcentaje de eficiencia implica enfrentarse a varios problemas de índole económico y ambiental (Patiño-Torres y Sanclemente-Reyes, 2014; Singh et al, 2018) Tales como alteraciones físico-químicas y biológicas en plantas y suelo; resultado de la bioacumulación, biotransformación y elevada toxicidad de las altas concentraciones de metales pesados que contienen los fertilizantes fosforados, finalmente se ve reflejado gradualmente en la reducción de producción y pérdida de fertilidad del suelo. (Rodríguez, 2017; Flórez y Zumaque., 2019).

En el uso de microorganismos biofertilizantes representa una alternativa sustentable y económicamente factible para mantener el equilibrio en el suelo, para dejar accesible al P (Corrales et al; 2015). Entre estos microorganismos solubilizadores de fosfatos (PSM) están los géneros: *Pseudomonas spp*, *Agrobacterium spp*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Burkordelia*, *Entherobacter*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Aspergillus*, *Alternaría*, *Cladosporium*, *Fusarium*, etc (Dandessa y Bacha, 2018).

Estos microorganismos prometen ser una estrategia para la agricultura sustentable; mejorando la producción mundial de alimentos y favorecer la agricultura orgánica para una alimentación más natural.

## 1.1 Objetivo general

Aislar, identificar y determinar la capacidad de solubilización de fosfatos y el efecto sobre cultivos de bacterias rizosféricas obtenidas a partir de *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*.

### 1.1.1 Objetivos específicos

1. Aislar e identificar rizobacterias con potencial solubilizador de fosfatos presentes en *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*.
2. Seleccionar y evaluar *in vitro* la capacidad de las bacterias solubilizadoras de fosfato.
3. Evaluar el efecto de la inoculación de Bacterias solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate y chile.

## 1.2 Hipótesis

**HI:** Los microorganismos solubilizadoras de fósforo incrementarán significativamente las variables agronómicas de crecimiento y desarrollo de las plantas de chile y tomate en condiciones de invernadero.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1.- El fósforo

El fósforo es un recurso no renovable obtenido de roca fosfórica, es uno de los macronutrientes vegetales esenciales más importante, debido a que permite que las plantas crezcan y se desarrollen al optimizar los procesos biológicos, genéticos y bioquímicos vitales en sus células. Es útil a las plantas para soportar inviernos, aumentar la eficiencia de agua, acelerar la madurez, incrementar la resistencia a enfermedades etc. En la actualidad, se conoce que el fósforo es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza, sin embargo, del P total en el suelo, solo el 1% está disponible para la planta (Munera y Meza, 2012; Mohammad, 2014). Por esta razón, se recurre a fertilizantes fosforados con el fin de asegurar el potencial de la expresión genética del fósforo en el cultivo (Vargas et al., 2009; Recatume, 2016; Li et al., 2017).

### 2.2.- El fósforo en el suelo

En la naturaleza el fósforo se puede encontrar en cuatro formas generales: (1) P inorgánico disponible, (2) P orgánico, (3) P absorbido y (4) P como mineral primario (Hyland et al., 2005); no obstante, la disponibilidad y la efectividad del fósforo en la nutrición de las plantas incide con las interacciones de otros elementos tales como el nitrógeno (N), calcio (Ca), amonio ( $\text{NH}_4$ ), aluminio (Al), magnesio (Mg), hierro (Fe) y Zinc (Zn) (Fernández, 2007).

Estudios reportan que el fósforo se absorbe durante el crecimiento de las plantas como aniones de ortofosfato monovalente ( $\text{H}_2\text{PO}_4$ ) y divalente ( $\text{HPO}_4$ ), cada uno en un 50% del fósforo total en la solución a un pH cercano a la neutralidad (pH 6-7). La ausencia de moléculas de fósforo soluble conduce a la utilización de fertilizantes fosforados que intentan cubrir la deficiencia de fósforo en los cultivos. A pesar de ello carecen de efectividad debido a que el fosfato soluble en agua reacciona rápidamente con los compuestos del suelo, formando hidroxiapatita, oxiapatita, fluoroapatita, carbonatoapatita, fosfato

tricálcico, fosfato diacalcico, fosfato monocalcico, livianita, estrengita variscita fosfato de amonio y fosfato de magnesio los cuales resultan ser poco solubles (Zapata y Roy 2007; Bobadilla y Rincón, 2008). (Cuadro 1).

Tipos de fosfatos	Denominación	Composición	Características
Fosfatos de calcio	hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $\text{Ca}(\text{OH})_2$	mayor abundancia
	Oxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; $\text{CaO}$	
	Fluorapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; $\text{CaF}_2$	mayor abundancia
	Carbonatoapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; $\text{CaCO}_3$	
	fosfato tricálcico	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	
	fosfato dicálcico	$\text{CaHPO}_4$	mayor solubilidad
	fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	mayor solubilidad
Fosfatos de Hierro	Livianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	
	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
Fosfatos de Aluminio	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	

**Cuadro 1.** Tipos de fosfatos (Tomada de Bobadilla y Rincón, 2008)

### 2.3.- Fertilizantes

Los fertilizantes son sustancias aplicables, obtenidas de la minería o procesos industriales que ofrecen cubrir las deficiencias de nutrientes en el suelo al proporcionar las condiciones ideales para el crecimiento, desarrollo y producción de los cultivos. Los fertilizantes con fósforo difieren en sus origen, efecto residual y eficiencia en la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Siendo clasificados como fertilizantes de fosfato minerales solubles, naturales y fertilizantes orgánicos.

Por otra parte, cada día se requiere mayores cantidades de fertilizantes por la creciente demanda de suministros alimenticios debido al crecimiento acelerado de la población. Sin embargo, los fertilizantes aun cuando muestran efectividad tienen poca residualidad y baja solubilidad en los suelos lo que deriva en pérdidas económicas y contaminación (suelo y agua) (Ober et al., 1999; Khan et al., 2018; Nolla et al., 2018).

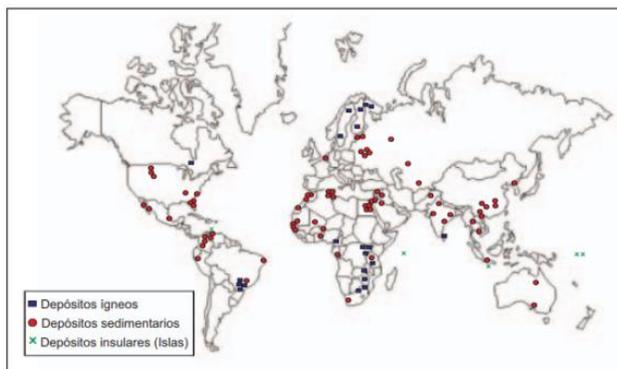
## **2.4.- La roca fosfórica (RF)**

El fósforo se encuentra en varios tipos generales de rocas: la de origen ígneo, la de origen sedimentario y la de origen metamórfico. En el caso donde el fósforo es de origen sedimentario se les conoce como “roca fosfórica” (RF) mientras que a las demás rocas ricas en minerales de fósforo (ígneas y metamórficas) pertenecen al grupo de rocas fosfáticas. De acuerdo a ello, al hablar de roca fosfórica nos estamos refiriendo al nombre colectivo que se le da a un mineral o agregado de minerales que contienen fósforo de origen sedimentario. (UPME, 2018; Zapata y Roy, 2007).

A pesar de que la RF, se encuentra distribuida alrededor del mundo, no todos los yacimientos pueden ser explotados debido a las características de las rocas y/o tamaños de depósito que no justifican la inversión para la industrialización. Por lo tanto, la roca fosfórica constituye un recurso finito y no renovable, utilizándola como materia prima para la producción de los fertilizantes fosfatados a través de su producto principal el ácido fosfórico, los fertilizantes fosfatados mundialmente son principalmente los fosfatos de amonio (mono y di amónico) y el superfosfato triple. El 80% del fósforo, proviene de la roca fosfórica explotada en el mundo debido a que los depósitos de origen ígneo a menudo tienen bajas concentraciones de P, son poco reactivos, no son apropiados para la aplicación directa a cultivos y su procesamiento requiere más inversión de tiempo (Castro y Melgar, 2005; Acosta et al., 2019).

## **2.4.- La roca fosfórica alrededor del mundo.**

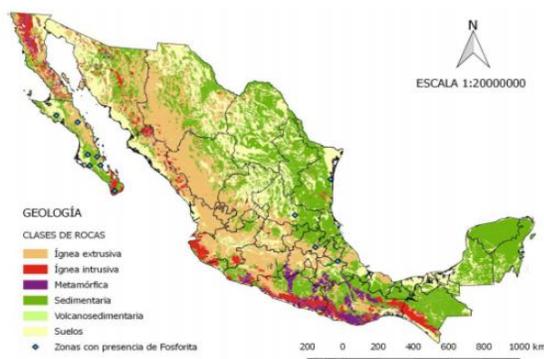
La producción de fertilizantes fosfatados ocupa el segundo lugar a nivel global, destacándose como los principales países en tener reservas mundiales y mayores productores de roca fosfórica los países de Marruecos, China, Estados Unidos y Rusia (Figura 1). En el ámbito mundial, un 85% de la roca fosfórica se usa en la producción de fertilizantes incluyendo su aplicación directa al suelo (Acosta et al, 2019).



**Figura 1.** Depósitos potencialmente económicos de fosfatos en el mundo (Fixen, 2009)

## 2.5.- El fósforo en México.

La Secretaría de Economía Nacional en 2018, menciona que cerca del 90% de los fosfatos producidos o adquiridos en México sirven para la elaboración de fertilizantes en forma simple o combinada y el resto es utilizado en diversas industrias de elaboración de detergentes, alimentos para animales y humanos, productos dentales, entre otros. El fósforo en México se extrae en Baja California Sur (80%) e Hidalgo (20%) (Figura 2). También es importado de los yacimientos de roca fosfórica provenientes de Marruecos (SE, 2018).



**Figura 2.** Clases de rocas y presencia de fosforita en México (Secretaría de Economía de México, 2018)

## **2.6.- Biofertilizantes**

Como se mencionó anteriormente a nivel global y nacional se emplean grandes cantidades de fósforo en la producción de fertilizantes fosforados lo cual ocasiona una problemática económica y ambiental que se incrementa año con año, por lo que se considera de vital importancia la búsqueda de alternativas que reduzcan los costos y sean amigables con el ambiente por lo que los biofertilizantes representan una gran oportunidad de mercado. Los productos a base de microorganismos benéficos vivos o latentes, al ser inoculados forman interacciones simbióticas con las raíces de las plantas facilitando su nutrición y/o soporte tanto para el huésped como al hospedante permitiendo que los ciclos biogeoquímicos mantengan el equilibrio del agroecosistemas (Gragreda-Cabrera et al., 2012; Aguirre-Joya et al., 2014; Wyciszkievicz et al., 2015), son una alternativa efectiva para reducir la contaminación ambiental de los suelos, al promover prácticas agrícolas amigables con el medio ambiente, reducir los costos y disminuir la contaminación ambiental al evitar el uso de fertilizantes sintéticos. (Beltrán 2014, Restrepo-Franco et al., 2015).

## **2.7.- Interacción suelo planta**

Después de algunos años de estudio se sabe que la principal fuente de fósforo para las plantas es el fosfato inorgánico (Pi). El cual se absorbe de la solución del suelo por medio de las raíces en forma de ion orto fosfato primario ( $H_2PO_4$ ) o bien como ion fosfato secundario ( $HPO_4$ ). Una vez dentro de la raíz, el P puede quedar almacenado o transportado a otras partes de la planta para estar disponible para diferentes reacciones como: la incorporación a compuestos orgánicos como ácidos nucleicos (ADN y ARN), fosfoproteínas, fosfolípidos, enzimas y compuestos fosfatados ricos en energía como la adenosina trifosfato (ATF); no obstante, el movimiento de este nutriente como de todos los demás dependerá del transporte de las membranas celulares. (Munera y Meza, 2012).

## 2.8.- Deficiencias de fósforo en plantas

La deficiencia o exceso de nutrientes, puede reflejarse de varias maneras a lo largo del ciclo fenológico de las plantas (Carruthers, 2017). Se ha demostrado que la deficiencia de fósforo en los cultivos puede ocasionar la reducción de la cosecha hasta un 50% y la disminución del contenido vitamínico. A menudo esta deficiencia se presenta con la aparición de una coloración verde oscura seguida de coloraciones púrpuras tanto en las hojas de la zona reproductiva como en el tallo principal. De igual forma, se puede presentar caída de flores, enrollamiento de hojas nuevas, frutos pequeños, retardos en la madurez, acidificación del fruto, menor masa radicular, así como también puede existir una reducción de la resistencia de plantas a enfermedades (Figura 3 y 4) (Martínez et al., 2009; Munera y Meza, 2012; Silva et al., 2017; Mahecha et al., 2019).



**Figura 3.** Coloraciones púrpuras en hojas y tallos de tomate



**Figura 4.** Enrollamiento de hojas nuevas en planta de chile

## 2.9.- Microorganismos solubilizadores de fósforo (MPS).

La biodiversidad microbiana del suelo juega un papel de suma importancia en el metabolismo de moléculas complejas, ayuda a la nutrición de las plantas y ofrece innumerables metabolitos útiles para la productividad agronómica.

(Sashidhar y Podile, 2010). Los microorganismos que poseen la capacidad de solubilizar e incrementar la disponibilidad de fósforo en el suelo sirven a su vez como suministro a las plantas (Patiño-Torres y Sanclemente-Reyes, 2014; Cuervo 2010; Rodríguez, 2002). Los MPS son capaces de crecer en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato. Además llevan a cabo la dinamización del fósforo a través de procesos como mineralización, inmovilización y solubilización, relacionados con su metabolismo nutricional (Fernández et al., 2005; Giovannini, J. 2013). Se ha descubierto que el gen de la glucosa deshidrogenasa (*gcd*), conocido como la primera enzima en la vía de oxidación directa, que contribuye significativamente a la capacidad de solubilización de fosfato mineral en varias bacterias Gram negativas (Muhammad et al., 2018). Cabe destacar que estos descubrimientos dieron origen a la búsqueda de microorganismos poseedores de estas características en diferentes nichos ecológicos, permitiendo identificar nuevos aislamientos potentes (Cuadro 2) (Galindo et al., 2006; Sharma et al. 2013; Restrepo- Franco et al., 2015).

MICROORGANISMO	LUGAR	AUTORES
<b>Bacterias</b>		
<i>Aeromicrobium, Aquaspirillum</i>	Manglar Colombia	Castañeda et al., 2006
<i>Bacillus megaterium, Bacillus aeruginosa, Rhizobium sp., Acinetobacter sp., Pseudomona Oryzihabitans</i>	Suelo calcáreo Florida	Liu et al., 2015
<i>Pseudomonas spp., Pseudomonas urantiaca, Serratia fonticola, Proteus spp, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Bacillus spp</i>	Argentina	García et al., 2015
<i>Aeromonas hydrophila, Rahnella aquatilis,</i>	Cundinamarca, Colombia	Becerra et al., 2011
<i>Arthrobacter ureafaciens, Phyllobacterium myrsinacearum, Rhodococcus erythropolis, Delftia sp</i>	Taiwán, China	Chen et al., 2006
<i>Kushneriasp. YCWA18</i>	Daqiao, China	Zhu et al., 2011
<b>Hongos</b>		
<i>Aspergillus niger</i>	Manglar Colombia	Castañeda et al., 2006
<i>Aspergillus P. Micheli, Penicillium, Tricoderma Pers, Fusarium</i>	Coahuila, México	Romero et al., 2019
<b>Ascomycetes:</b>		
<i>Dabaryomyces Cf. Hansenii</i>	Manglar Colombia	Castañeda et al., 2006
<i>Streptomyces, Microbacterium, Angustibacter, Kocuria, Isopterocola, Agromyces.</i>	Isla de Choraq, provincia de Goa, India.	Dastager et al., 2013
<b>Levadura :</b>		
<i>Candida famata</i>	Cundinamarca Colombia	Becerra et al., 2011

**Cuadro 2.-** Biodiversidad de microorganismos solubilizadores de fosfatos

## 2.10.- Procesos microbianos de solubilización de fósforo

Los microorganismos que llevan a cabo la solubilización de fósforo emplean tres mecanismos:(1) Liberación de compuestos complejos p.ej. aniones ácidos orgánicos, sideróforos, protones, iones hidroxilo, CO<sub>2</sub>, (2) liberación de enzimas extracelulares o también se conoce como mineralización bioquímica del P y (3) la liberación de P durante la degradación de sustrato (McGill y Cole 1981), a su vez generando diferentes procesos como acidificación del medio, formación de complejos metálicos, reducción de metales, disolución de fosfatos mediados por enzimas, disolución indirecta de fosfatos y liberación de fósforo en el suelo (Restrepo- Franco, 2015).

MECANISMO	TIPO DE PROCESO	TIPO DE REACCIÓN	APLICABILIDAD DE FOSFATOS
Liberación de compuestos complejos	Acidificación del medio	Reducción del PH Formación de hidrofosfatos.	Fosfatos de Ca <sup>2+</sup>
	Liberación de ácidos orgánicos o complejos (quelantes)	Formación de complejos metálicos.	Fosfatos de Ca, Al <sup>3+</sup> y Fe <sup>3+</sup>
	Actividad redox de bacterias o sus exudados (metabolitos secundarios)	Reducción de metales con estados de oxidación variables a un bajo estado de oxidación	Fe <sup>3+</sup> fosfato
Liberación de enzimas extracelulares o mineralización bioquímica del P	Liberación extracelular de enzimas específicas ( fosfatasas)	Hidrolisis de enzimas de esterres de fosfato orgánico pobremente solubles	Varios esterres de fosfatos orgánicos (fitatos, fosfolípidos)
Liberación del P durante degradación de sustrato	Disolución indirecta de fosfatos	Liberación de complejos metálicos por interacción planta -microorganismo	Fosfatos de Ca <sup>2+</sup> - Al <sup>3+</sup> y Fe <sup>3+</sup>

**Cuadro 3.** Procesos de solubilización de fosfatos. Tomado de Restrepo-Franco et al., (2015)

## 2.11.- Los ácidos orgánicos y la solubilización de fosfatos

Uno de los mecanismos más conocidos para la solubilización de P; es la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular producido por las rizobacterias. Estas poseen la capacidad de no solamente acidificar la rizósfera, sino también formar complejos con Al y Fe aumentando así, la disponibilidad del

P para la nutrición de las plantas. Se ha reportado que participan los ácidos oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indolacético y 2–cetoglucónico. Resaltan algunos géneros bacterianos que los producen como *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium* y *Erwinia*. (Paredes-Mendoza et al., 2010)

Ácido	Fórmula	Ruta biosintética	Bacteria que lo produce	Referencia
Acético	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	Oxidación incompleta de azúcares (fermentación acética)	<i>Acetobacter acetii</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Singh y Amberger (1998a)
Láctico	CH <sub>3</sub> CHOH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	(Glicólisis) Fermentación láctica primaria	<i>Bacillus liqueniformis</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bano y Musarrat (2003)
Oxálico	HO <sub>2</sub> CCO <sub>2</sub> H	Ácidos tricarbóxicos	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Singh y Amberger (1998a)
Cítrico	HO <sub>2</sub> CCH <sub>2</sub> COHCO <sub>2</sub> HCHO <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	Ácidos tricarbóxicos	<i>Erwinia herbicola</i> y <i>Yarrowia lipolytica</i>	Goldstein (1995); Vassileva et al. (2000)
Butírico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	Oxidación anaerobia del piruvato	<i>Bacillus liqueniformis</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Wan y Wong (2004)
Succínico	HO <sub>2</sub> CCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	Ciclo del glioxilato y ácidos tricarbóxicos	<i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Liu et al. (1992)
Málico	HO <sub>2</sub> CCHOHCH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	Ácidos tricarbóxicos	<i>Bacillus megaterium</i>	Singh y Amberger (1998b)
Glucónico	HO <sub>2</sub> C(CHOH) <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> OH	Oxidación directa de la glucosa	<i>Erwinia herbicola</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>	Goldstein y Liu (1987)
Fumárico	HO <sub>2</sub> CCOCH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	Ácidos tricarbóxicos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Harrison et al. (1972)
2-Cetoglucónico	HO <sub>2</sub> CO(CHOH) <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> OH	Oxidación directa de la glucosa	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Rhizobium meliloti</i> y <i>Bacillus firmus</i>	Anderson et al. (1985)

**Cuadro 4.** Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en bacterias solubilizadoras de fosfatos. Tomado de Paredes-Mendoza et al., (2010)

## 2.12.- Bacterias solubilizadoras de fosfatos

Existen diferentes géneros bacterianos poseedores de la capacidad de promover el crecimiento vegetal, por medio de la solubilización de fosfatos efectuada al producir enzimas del tipo fosfatasa que hidrolizan los enlaces orgánicos fosfatados o bien mediante la producción de ácidos orgánicos. (Anzuay et. al., 2017; Cisneros- Rojas et al., 2017; Andrés et al., 2019). Estos microorganismos pudiesen llegar a tener una mayor posibilidad de adaptabilidad en el campo, siendo una alternativa agroecológica en la

formulación de biofertilizantes que ayuden a disminuir el impacto ambiental ocasionado por el uso de fertilizantes fosforados (Armenta-Bojórquez et al., 2010). Sin embargo, se ha reportado que el éxito de estos inoculantes dependerá de la selección, origen, capacidad para colonizar la rizósfera y mantener la actividad biológica de a cepa. (Abdel.Aziez et al., 2014).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología, Departamento de Parasitología, así como en los invernaderos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), de la ciudad de Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.

### **3.1.- Aislamiento y purificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) a partir de muestras rizosféricas**

Se utilizó la metodología reportada por Patiño (2014) y Matías (2018) para el aislamiento de BSF que consistió en la selección aleatoria de raíces de gramíneas desarrolladas naturalmente en bosques de Saltillo, Coahuila, México. Las raíces colectadas y colocadas en bolsas plásticas se transportaron en hielera al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Las raíces fueron lavadas con agua corriente para quitar el exceso de suelo, se desinfectaron con hipoclorito al 3% por 30 segundos y se lavaron con agua destilada estéril tres veces. Las muestras fueron colocadas y maceradas en tubos falcón con agua destilada estéril. Posteriormente con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una muestra y se sembró en forma de estría en el medio NBRIP (Dextrosa (10g),  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  (5g),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,25g), KCl (0,2g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,15g), Agar (18g))(Flores-Zarate et. al.,2014), específico para microorganismos solubilizadoras de fosfatos, dejándose incubar a 28°C por 48 horas. Finalmente se purificaron las colonias que presentaban halos de solubilización de fosfatos por medio de resiembra en tres cuadrantes.

### **3.2.- Identificación y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo**

La identificación de los aislamientos se efectuó por caracterización morfológica, bioquímica y molecular de los cultivos. Para su descripción se observaron frotis *In vivo* y semipermanentes al microscopio compuesto, para describir su

morfología celular, tinción Gram, formación de colonias, tamaño, pigmento, borde, elevación y textura. Además se realizaron pruebas de crecimiento en diferentes medios de cultivo (NBRIP, Agar nutritivo, Kb, Mc.conkey, YEM), y la determinación de ureasas, citratos, catalasas, oxidasas (Schaad et. al., 2001; Molano, 2004). También se efectuó las pruebas de fluorescencia en medio KB (King et. al., 1954) incubado a 28°C durante 48 horas, para detectar fluorescencia en las placas por observación a través de un trasluminador de luz Uv de biolmaging system.

Finalmente las cepas purificadas se enviaron por duplicado al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), para ser identificadas y caracterizadas por secuenciación de las regiones interespecíficas de DNA genómico (PCR-ITS).

### **3.3.- Pruebas de patogenicidad**

Se realizaron tres pruebas de seguridad de laboratorio para detectar indicios de riesgo fitosanitario y comprobar si alguno de los aislamientos representará o provocará daños vegetales en plantas de importancia agrícola según Shaad et al, (2001) y Duarte (2007).

#### **3.3.1.- Pudrición de tubérculo de papa**

Se tomó un tubérculo de papa que se lavó, secó, desinfectó con etanol al 70% y flameó. Posterior se cortó rebanadas de papa de aproximadamente 5 mm de grosor y se colocaron en cajas Petri con papel filtro estéril. A cada una de las rebanadas se les hace una incisión superficial y solo en una de ellas se inocula la bacteria BSF. Finalmente se le adiciona unos 2-3 ml de agua estéril para humedecer el papel y crear un ambiente húmedo y se incubó a 28°C de 24-48 horas. A partir de las 24 horas, se observa el tejido de cada una de las rebanadas y sí en la papa inoculada se sintetizan enzimas pectolíticas es muy probable que se presente la pudrición y el ennegrecimiento.

### **3.3.2.- Dihidrólisis de arginina**

Cada cultivo bacteriano de BSF se inoculó por picadura en 3 tubos con medio de cultivo arginina (peptona 1g, NaCl 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3, agar 3g, rojo fenol 0.0003g, L(+) hidrocloreuro de arginina 10g, agua destilada 1000ml), se introdujo el asa recta previamente flameada al tubo no inoculado con la bacteria, se adiciono 1ml aproximadamente de aceite mineral estéril a cada uno de los 3 tubos, se incubó a 28°C durante 72 horas. Si la bacteria presenta arginina desaminasa y la citrulina ureidasa, en el medio de cultivo se acumulará NH<sub>3</sub>, el cual lo alcalinizará, provocando que el indicador rojo de fenol vire del color rosa violeta, por lo que la prueba será positiva.

### **3.3.3.- Reacción de hipersensibilidad**

Se preparó una suspensión bacteriana con 10<sup>7</sup> UFC/ml de cada BSF y por medio de una jeringa estéril, se infiltro a los espacios intercelulares de una hoja de tabaco (*Nicotiana tabacum*) ya sea a través de la nervadura central o lámina foliar.

Las plantas tratadas se mantienen a temperatura ambiente (20°- 30°C). Si dentro de las 24 horas posteriores a la inoculación, la zona infiltrada presenta perdida de turgencia o necrosis, la prueba se considera positiva.

### **3.4.- Eficiencia de solubilización de fosfatos (ESF)**

La eficiencia de los aislamientos bacterianos en solubilizar fosfato en placa se cuantifico mediante la técnica de Patiño,(2010), para ello cada bacteria se inoculo por picadura al centro de cinco cajas Petri con el medio solido NBRIP. Las caja se incubaron a 30°C por 7 días, al término se evaluó la relación de eficiencia solubilizadora de fosfatos (ESF), según la relación hidrolisis/crecimiento.

$$\text{ESF} = \frac{\text{Área de halo de solubilización}}{\text{Área de crecimiento de la colonia}}$$

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, bajo un arreglo completamente al azar en el paquete estadístico JMP8 (SAS, 2002). Las medias de los valores de eficiencia en solubilización de fosfato (ESF) se compararon y estratificaron según la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

#### **3.4.1.- ESF en diferentes pHs y concentraciones de roca fosfórica**

Se evaluó la capacidad de crecimiento de las bacterias en las diferentes condiciones de pH presentes en suelos (5.5, 6, 6.5, 6.8, 7), a través de la elaboración de medio NBRIP, donde las diferentes cepas se inocularon por triplicado y se evaluaron después de 168 horas en incubación a 30°C. Una vez obtenidos los datos, se eligió el medio con el pH óptimo de crecimiento, probando con diferentes concentraciones de  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  (1, 2.5, 3.5, 5, 6  $\text{g/L}^{-1}$ ). Dejando en incubación a 30°C por días midiendo la eficiencia solubilizadora de fosfato por medio del crecimiento de la colonia y el halo de solubilización de la misma.

#### **3.5.- Cuantificación de solubilización de fosfato inorgánico (IPS)**

Las cepas seleccionadas de acuerdo a su eficiencia en solubilizar fosfatos se propagaron en matraces Erlenmeyer, con 200 ml de medio líquido de NBRIP estéril. Los cuales fueron inoculados con 1ml de inóculo de cada aislamiento. Para ello se usó matraces Erlenmeyer bafleados de 500ml conteniendo 200 ml de medio cultivo líquido de NBRIP estéril, se utilizaron 3 repeticiones por cada bacteria. Los matraces se mantuvieron en agitación (150rpm) a 30°C durante 2 días. Posteriormente 10 ml de cada matraz se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min, enseguida se tomaron 5 ml del sobrenadante y se mezclaron con 800  $\mu\text{l}$  de reactivo mixto (50 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2.5 M, 15 ml de Molibdato de amonio al 4%, 30 ml de ácido ascórbico 0.01 M y 5 ml de solución de tartrato de potasio 0.004M). Para la cuantificación del fósforo en el medio, se elaboró una curva estándar en concentraciones de 0.15, 0.3, 0.6, 0.9, 0.12, 0.5  $\text{mg/L}^{-1}$  a partir de una solución madre de 50  $\text{mg/L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . La absorbancia de la reacción colorimétrica se leyó a 880nm en un espectrofotómetro Thermo

Spectronic (Murphy y Riley, 1962).

### **3.6.- Determinar la síntesis de ácidos orgánicos**

Se reporta que las rizobacterias poseen la capacidad para promover el crecimiento vegetal a través de la síntesis de ácidos orgánicos. Los cuales se determinan a través de métodos colorimétricos. Para ello se preparó Medio-ST (Medio Sacarosa-triptona) el cual contiene: Sacarosa (20g/l), Triptona (5g/l), solución de elementos trazas (SET) (10 mL). La solución SET estuvo compuesta por (mg por litro):  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (20),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (200),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (20),  $\text{FeCl}_3$  (100),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (20),  $\text{ZnCl}_2$  (280). Después de inocular cada bacteria de manera individual e incubar en agitación (150rpm) a 30°C durante 24hrs. Se agregó el indicador azul de bromotimol al 0.1%, una prueba positiva cambia el indicador a color amarillo que indica la acumulación de ácidos orgánicos en el medio.

### **3.7.-Producción de acetoina**

La producción de acetoina se detectó por el medio de cultivo Vorges-Proskauer consiste en: Peptona (7g /l), Glucosa (5g /l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 g /l), ajustando el pH 7,0  $\pm 0,2$  unidades. Se inocularon e incubaron las cepas por 48 horas a 30°C. Finalmente se indujo la respuesta colorimétrica utilizando los reactivos Vorges A (5%  $\alpha$ -naftol) y Vorges B (KOH). Trascorridos 30 min si, se aprecia un color rosa-rojiza en el medio indica la presencia de acetoina caso de ser positivo o permanece amarillo al ser negativo.

### **3.8.-Ensayo cualitativo de ácido indol Acético (AIA)**

Se preparó 50 ml de medio líquido BT modificado (5g de glucosa, 1gr  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.4g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.2g NaCl, 0.4g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 20g triptona) en matraces bafleados de 250 ml, una vez esterilizados se inocularon con cada aislamiento BSP y se incubaron por 48 horas a 30°C a 150 rpm. Posteriormente se tomó 1ml de solución bacteriana, se colocó en un tubo de ensayo, agregando 1ml de

agua estéril y 1ml de reactivo de Salkosky a partir de cloruro férrico en ácido sulfúrico (Glickmann y Deessaux, 1995; Peñin, 2017).

### **3.8.1.- Cuantificación de ácido indol acético (AIA)**

La concentración de AIA producido a partir de la fermentación microbiana de cada BSF, se determinó por espectrofotometría utilizando el reactivo de Salkowski (Glickmann y Deessaux, 1995) y una curva de calibración con un estándar de AIA (Sigma®) en concentraciones de: 100, 50, 40, 30, 20, 10 y 5 ppm, se usó agua desionizada y reactivo de Salkowski como indicador en relación 1:1.

Para cuantificar la concentración de AIA presente en el caldo de fermentación obtenido a partir de las cepas bacterianas, se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 de cada muestra con agua desionizada, posteriormente se tomaron 0.5 ml de cada dilución y se colocaron en tubos de ensaye de 5 ml. A cada tubo, se adicionaron 0.5 ml de reactivo de Salkowski (1:1), permaneciendo en reposo durante 30 minutos en condiciones de obscuridad. Se empleó como blanco una dilución de AIA en agua desionizada. Finalmente se realiza la lectura  $\lambda 530\text{nm}$ , haciendo uso de un espectrofotómetro (Genesys 20).

### **3.9.- Efecto de BSF en el crecimiento *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum*.**

Se emplearon plantas de 15 cm de *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum*, trasplantadas a sustrato estéril integrado con peat moss y perlita (3:1), saturado con fosfato insoluble ( $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ ). La aplicación de las BSF se realizó cuando las plantas mostraron los primeros síntomas de deficiencia de fosfatos (Tabla1).

La distribución de tratamientos en el área experimental se llevó a cabo mediante un diseño completamente al azar, la unidad experimental consto de 7 tratamientos con 6 repeticiones (3 testigos 4 tratamientos) arrojando un total de 42 unidades experimentales por cultivo. Al finalizar 60 días, se evaluaron diferentes parámetros agronómicos (Nº de hojas, longitud de tallo y raíz, peso

fresco, peso seco) realizando una análisis de varianza y prueba media de Tukey, ( $P=0.05$ ) con el programa estadístico JMP8 (SAS, 2002), bajo un diseño experimental completamente al azar.

**Tabla 1.** Esquema experimental de tratamiento de BSF en *Solanum Lycopersicum* y *Capsicum annum*

NOMBRE DE TRATAMIENTO	COMPOSICIÓN DE TRATAMIENTO
Control 0	Agua
Control +	4.4 G/L - $\text{KH}_2\text{PO}_4$
Control -	5 Gr/L $\text{Ca}_3\text{P}_0_4$
Tratamientos experimentales	15ml/L bacterias



### 3.10.- Promoción de la germinación de semillas con inóculos de BSF.

Para evaluar el porcentaje de germinación inducida por los inoculantes bacterianos, se llevó a cabo la reproducción de las cepas en medio KB (King et al., 1957), las cuales fueron inoculadas y mantenidas en agitación (150 rpm) durante 48 horas. Al finalizar el tiempo de incubación. Las semillas previamente desinfectadas se dejaron imbibir en cada uno de los tratamientos durante 24 horas, seguido de esto se colocaron en cajas Petri con papel filtro estéril y permaneciendo en incubación durante 5 días en condiciones de obscuridad a  $27^\circ\text{C}$ . Se estableció un diseño experimental completamente al azar, con de 7 tratamientos con 3 repeticiones. Para su evaluación se calculó el porcentaje de germinación por tratamiento donde la variable a evaluar fue el N° de semillas germinadas con cada aislamiento solubilizador de fosfato. (BSP). (Castro, 2013; Flores-Zárate, 2018)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.- Identificación y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF).

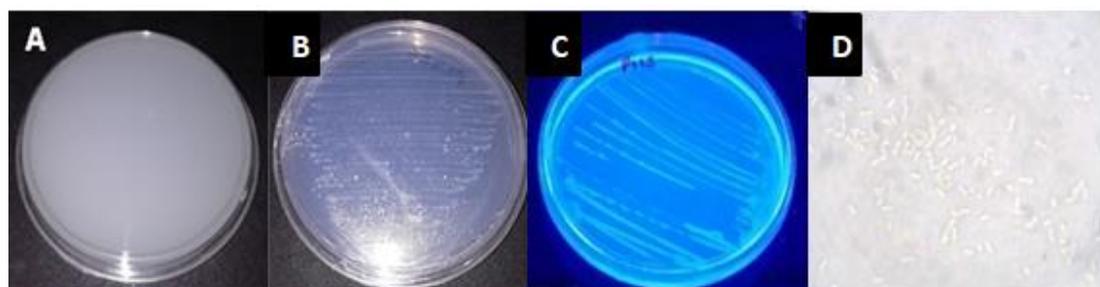
A partir de la rizosfera de dos tipos de gramíneas (*Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*) de la Sierra Madre Oriental del estado de Coahuila, se logró recuperar 4 aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) en el medio de cultivo NBRID. La identificación a nivel género se obtuvo considerando las características morfológicas celulares, de colonia y bioquímicas en base a los criterios establecidos por Shaad (2001). Donde todos los aislamientos fueron Gram negativas tal y como se muestran en el siguiente Cuadro (5). Los aislados se caracterizaron por presentar forma bacilar y formar colonias circulares con coloraciones blancas y cremas. Además de poseer la capacidad de crecer en diferentes medios de cultivos y en diferentes concentraciones de  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  que oscilan entre 1gr/L a 5gr/L bajo distintas condiciones de pH. Los aislados presentaron la capacidad muestran tener la capacidad para producir catalasas, oxidasas, reducir nitratos y emitir fluorescencia.

**Cuadro 5.** Comportamiento bioquímico de BSF aisladas de *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*

Aislado Bacteriano	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasas	Fluorescencia	Ureasa	Citratos	Producción Levana	Dihidrolasa arginina	Ácido indol Acético	Acetoina	Medio nutritivo	Medio KB	Medio YEM	Medio NBRIP	Crecimiento en Mc.Conkey	Crecimiento NFB	Hipersensibilidad tabaco
<i>Pseudomonas sp.(PS2)</i>	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas sp.(C10)</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>Serratia sp.(PTS)</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Serratia sp.(BP1)</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-

(-)-Prueba negativa; (+) Prueba positiva

Con base en la secuenciación de las regiones interespecíficas de DNA genómico (PCR-ITS) y comparado estos datos con los registrados en GenBank (NCBIR), se confirmó la presencia de los géneros: *Serratia* y *Pseudomonas* (Cuadro 5). Estos aislados bacterianos han sido reportados por diferentes investigadores como microorganismos altamente efectivos al momento de incrementar la disponibilidad del P, además de contribuir a la modificación del pH del suelo. (Brito y Ulla, 2012; Farhan et al., 2019; Rezakhani et al, 2019). Cabe mencionar que el género *Serratia* como lo han mencionado Álvarez et al., 2014, y Ramírez Rojas et al.,(2016), solo algunas especies de *Serratia* producen pigmento rojo (prodigiosianina) y se relaciona con la especie patógena para plantas y animales, sin embargo, nuestros aislados no lo generan, tiene la capacidad para solubilizar fosfatos y molecularmente no coinciden con *Serratia marcescens*, además de haberse aislado de raíces de zacates, por lo que factiblemente pudieran ser cepas no descritas o que no se encuentran como referencia en GenBank. Algunos autores han mostrado que el potencial de estos microorganismos dependerá de su mecanismo de solubilización, genética molecular y su capacidad de liberar P en el suelo (Motsim et al., 2019).



**Figura 5.** Crecimiento colonial y celular de BSF. A) Medio sin inocular; (B) Siembra por estría de BSF en medio NBRIP; (C) Prueba de fluorescencia BSF; (D) Frotis *in vivo* de BSF

#### 4.2.- Patogenicidad de cepas bacterianas

El riesgo fitopatológico del uso de las BSF recuperadas de gramíneas fue descartado al realizar las pruebas de: dihidrólisis de arginina, pudrición de tubérculo de papa y reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco, al obtener resultados negativos, con lo cual es factible poder experimentar su empleo como inoculantes bacterianos promotores de crecimiento en plantas (Tabla 3) Los aislamientos mostraron la ausencia de pudrición con halo oscuro en tubérculos de papa, necrosis en hojas de tabaco y carecen de crecimiento en medio con arginina (Guzmán, 2007).

**Tabla 2.** Pruebas de patogenicidad de BSF

Aislado bacteriano	<i>Pseudomonas sp. (PS2)</i>	<i>Pseudomonas sp. (C10)</i>	<i>Serratia sp. (PTS)</i>	<i>Serratia sp. (BP1)</i>
Dihidrólisis de arginina (+/-)	-	-	-	-
Pudrición de tubérculo papa (+/-)	-	-	-	-
Reacción de hipersensibilidad (+/-)	-	-	-	-

(-)Prueba negativa; (+) Prueba positiva

Estos datos son consistentes también con Cores et al., (2016) quien reporta que los microorganismos carentes de producción enzimas pectolíticas y/o turgencia o necrosis son considerados como no fitopatógenos, al igual que Duarte (2007), quien reporta que las pruebas de patogenicidad representan una herramienta eficiente para la detección de un agente infeccioso.



**Figura 6.** Pruebas de patogenicidad de BSF a) Dihidrolisis de arginina b) Necrosis en tubérculo de papa c) Hipersensibilidad en planta de tabaco.

### 4.3.- Eficiencia de solubilización de Fosfatos (ESF)

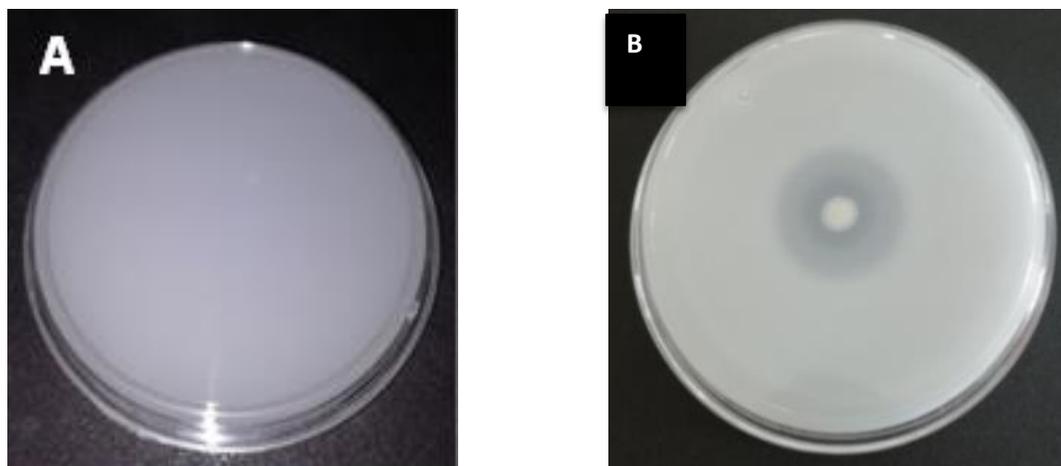
En el tabla 3, se proporciona una visión general de la ESF de cada uno de los aislados bacterianos obtenidos. A partir de estos datos se puede observar que las cepas correspondientes a los géneros *Serratia* (BP1) y *Pseudomonas sp* (C10) poseen la mayor eficiencia de solubilización de fosfatos a partir de  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ , en comparación con las demás bacterias evaluadas.

**Tabla 3.** Capacidad de solubilización de fosfatos en medio NBRIP solido de bacterias aisladas a partir de *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*

Aislado Bacteriano	Similitud Gen SIN	
	GenBank (%)	ESF
<i>Pseudomonas sp.</i> (PS2)	95%	2.89 ± 0.11 b
<i>Pseudomonas sp.</i> (C10)	96%	3.24 ± 0.06ab
<i>Serratia sp.</i> (PTS)	98%	2.91 ± 0.11 b
<i>Serratia sp.</i> (BP1)	95%	3.57 ± 0.05 a

Valores de medias estadísticas con la misma letra son similares estadísticamente según Tukey ( $\alpha=0.05$ )

Los parámetros de evaluación son consistentes con lo reportado por Scattereggia (2016), quien determino el índice de solubilización de fosfatos en medio solido permite aislar bacterias con capacidad sobresaliente para solubilizar fosfatos, lo cual se observó al cuantificar ESF en las bacterias aisladas que mostraron diferencias marcadas de solubilización que oscila desde un 10 hasta 76% entre ellas.



**Figura 7.** Vista de placa de cultivo para evaluar eficiencia solubilizadora de fosfatos por BSF en medio de cultivo NBRIP. (A) Medio sin inocular; (B) Medio inoculado

#### 4.4.- Efecto del pH en la solubilización de fosfato.

El comportamiento de estas bacterias es muy importante para su empleo, dado que la variación en el pH del suelo es muy amplia dependiendo del área, región y clima, además de ser determinante en la capacidad de cada bacteria para solubilizar fosfatos. El uso del medio sólido para solubilizar fosfato representa una medida de la capacidad de cada microorganismo para soportar concentraciones específicas de fósforo insoluble, sin desplazarse, así como también sus posibilidades para movilizarse hidrolizando fósforo insoluble como lo es el  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ , que representa el compuesto más común de encontrar en el suelo. Es importante observar que la capacidad de solubilización de las bacterias no se incrementa o disminuye de manera gradual, tal y como se muestra en el caso de las cepas BP1 Y PTS correspondientes al género *Serratia*, Por otro lado las cepas del género *Pseudomonas* se ven cambios poco significativos entre la ESF en los diferentes pH. Las cepas *Pseudomonas* (C10) y *Serratia* (BP1) fueron los que obtuvieron un halo grande para solubilizar al  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  y lo mantuvieron estadísticamente diferente a los demás

aislamientos en todos los diferentes rangos de pH evaluados como se observa en el tabla 4.

**Tabla 4.** Eficiencia de solubilización de fosfato de aislados bacterianos de gramíneas *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura* en diferentes pHs

Aislado Bacteriano	ESF pH 5.5	ESF pH 6	ESF pH 6.5	ESF pH 6.8	ESF pH 7
<i>Pseudomonas sp. (PS2)</i>	1.87±0.8 c	2.37± 0.08 b	2.63 ±0.36 bc	1.87 ± 0.08 bc	2.83 ± 0.04c
<i>Pseudomonas sp. (C10)</i>	3.22±0.15b	5.11 ±0.02 a	3.76 ± 0.26 ab	4.17 ±0.19 a	5.16 ± 0.03 a
<i>Serratia sp. (PTS)</i>	1.86±0.14 c	2.26 ± 0.12 b	1.81 ± 0.18 cd	2.35 ± 0.06 b	1.91 ±0.00d
<i>Serratia sp. (BP1)</i>	4.27±0.21 a	4.87 ± 0.17 a	4.49 ± 0.25 a	4.42 ± 0.06 a	3.91 ±0.03b

Valores con la misma letra son similares estadísticamente según Tukey ( $\alpha=0.05$ )

#### 4.5.-Efecto de la concentración de $\text{Ca}_3\text{P}_0_4$ sobre la capacidad solubilizadoras de bacterias *in vitro*.

La capacidad de hidrolizar un sustrato está en función de su concentración, con esta finalidad se evaluó a las BSF al crecer bajo diferentes concentraciones de  $\text{Ca}_3\text{P}_0_4$  (Tabla 5), y poder seleccionar los aislamientos con base en su capacidad de solubilización. Se observó que los géneros *Serratia sp* (BP1) y *Pseudomonas* (C10) muestran un mayor halo de hidrolisis en el medio de cultivo comparativamente con las demás bacterias. Los halos de solubilización de fosfatos fueron muy evidentes en tamaño y concentración, por lo que es relativamente simple observarlos y diferenciarlo los aislamientos más eficientes *in vitro*. En su investigación Kim et al., (1997) y Ginés y Sancho (2002) han reportado que la caída del pH del suelo juega un papel importante en la eficiencia de la asimilación de nutrientes.

**Tabla 5.** Determinación de la capacidad *in vitro* de solubilización de fosfatos de aislamientos bacterianos presentes en *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*.

Aislado bacteriano	ESF Ca <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1 mgL <sup>-1</sup>	ESF Ca <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1.5 mgL <sup>-1</sup>	ESF Ca <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 2 mgL <sup>-1</sup>	ESF Ca <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 2.5 mgL <sup>-1</sup>
<i>Pseudomonas sp. (P2S)</i>	3.70 ± 0.20 a	3.11 ± 0.19 b	1.96 ± 0.26 b	1.51 ± 0.07 c
<i>Pseudomonas sp. (C10)</i>	3.56 ± 0.12 a	3.97 ± 0.18 a	3.63 ± 0.23 a	3.13 ± 0.05 b
<i>Serratia sp. (PTS)</i>	1.45 ± 0.05 b	1.47 ± 0.02 c	1.24 ± 0.08 bc	1.46 ± 0.15 c
<i>Serratia sp. (BP1)</i>	3.83 ± 0.08 a	3.31 ± 0.15 ab	3.76 ± 0.08 a	3.61 ± 0.06 a

Valores con la misma letra son similares estadísticamente según Tukey (P=0.001)

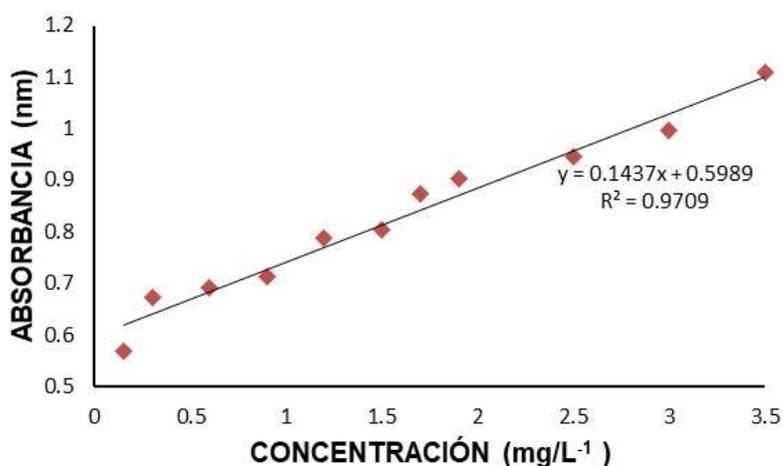
La concentración de fosfatos en el medio de cultivo, como su existencia de manera insoluble en el suelo son factores limitantes del crecimiento de microorganismos, esta variable también pudiera ser un componente selectivo para usar aquellas bacterias que resistan altas concentraciones de roca fosfórica para poder ser considerados como idóneos en su aplicación al suelo. En la Tabla 5, se muestra el comportamiento de las 4 BSF en medio de cultivo NBRID conteniendo de 1g/L hasta 2.5g/L de Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Se observa que todas las bacterias utilizan y solubilizan la fosforita en diferentes rangos de concentración, es notorio que existen diferencias numéricas y estadísticas (P= 0.05) en los halos de solubilización entre cada bacteria, sin embargo, resaltan por su actividad los aislamientos de *Serratia sp.* y *Pseudomonas sp.*, que mantiene su actividad de solubilización de fosfatos desde 1g hasta 2.5g/L de Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Negrete et al.,(2018), indican que las bacterias solubilizadoras de fosfatos aisladas de *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*, logran desarrollarse en medios de cultivo hasta con 5g/L de roca fosfórica, 50% mayor que la concentración que se empleó en este trabajo, sin embargo, los halos de solubilización que se muestran en esta publicación son apenas perceptible, no así en nuestros experimentos donde se aprecia hasta 2.7mm de halos de solubilización muy superiores a los mostrados por este autor.

Reportes publicados sobre este tema por Patiño (2014) sobre el aislamiento de BSF, muestran que los zacates criollos o nativos son un buen reservorio de microorganismo biofertilizantes y dentro de ellos los fijadores de nitrógeno y los solubilizados de fósforo, algunos de los géneros que este trabajo reporta como activos para solubilizar fósforo *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Serratia* y

*Pseudomonas*, considerando que la fuente de estas bacterias fueron dos zacates silvestre de la Sierra Madre Oriental de Saltillo.

#### 4.6 Cuantificación de la solubilización de fosfato inorgánico (IPS)

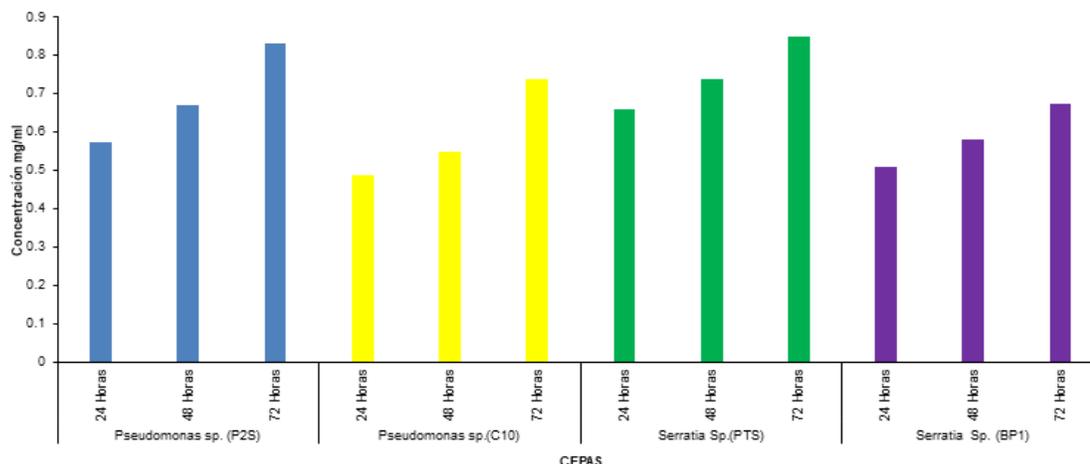
Para determinar el contenido del fósforo soluble presente en caldo de fermentación con fósforo insoluble y BSF, se realizó primero una curva estándar de solubilización de fosfatos con base en determinaciones colorimétricas basadas en el método del azul del ácido ascórbico (Rodríguez-Gómez et al., 2013) que se muestran en la Gráfica 1.



**Gráfica 1.** Curva estándar colorimétrica de fosfatos solubles basados en el método de azul de ácido ascórbico.

Alícuotas libres de células de caldos de cada aislamiento bacteriano fueron procesadas a través del método de azul del ácido ascórbico para cuantificar fosfatos, se observó que la capacidad para solubilizar se incrementa con el tiempo de incubación donde los aislados de *Pseudomonas sp.*, (PS2) y *Serratia sp.*, (PTS) Se destacan como los que producen mayor cantidad de fósforo solubilizado lo que oscila entre los 0.6 y 2  $\mu\text{g/ml}$ , cantidad de fosfato soluble muy similar a la Rodríguez-Gamez et al., (2013), y Santa Cruz (2018), quienes reportaron valores similares de concentración de fósforo soluble producidos

microorganismo en cultivo. Si bien todas las BSF pudieron solubilizar fosfatos ellas se diferencian por su capacidad y rapidez en solubilizarlo tal y como se muestra en la Grafica 2.



**Gráfica 2.** Capacidad de solubilización de fosfatos de bacterias aisladas de *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura* en cultivo sumergido.

#### 4.7.- Síntesis de ácidos orgánicos en bacterias solubilizadoras de fosfato.

Paredes-Mendoza et al., (2010), mencionan la síntesis de diversos ácidos orgánicos en rizobacterias como uno de los mecanismos más ampliamente conocidos para solubilizar fosfato en el suelo. De tal manera, que la presencia de ácidos orgánicos está directamente relacionada con su eficiencia para usarse con este fin. En la Tabla 6 se muestra que todas las bacterias acidificaron el pH de crecimiento del medio de cultivo con lo cual indirectamente se asume que producen ácidos orgánicos. Uno de estos ácido se detectó directamente como un factor de promoción de crecimiento, que también resulta interesante dado que es una auxina de crecimiento vegetal y es el Ácido Indol Acético, que se detectó mediante el reactivo de Salkowsky y donde se observó también que todas las bacterias producen esta hormona.

Un derivado del ácido acético es la acetoína, el cual se detectó mediante el reactivo de Vorges Proskauer, donde solo resulto positivo solo para algunos

aislamientos, por lo que se asume que cada bacteria pudiera solubilizar fosfato mediante distinto tipo de síntesis de ácido orgánico.

**Tabla 6.** Síntesis de ácidos orgánicos por bacterias solubilizadoras de fosfato en medio de cultivo BT modificado y Vorges-Proskauer

Aislado bacteriano	<i>Pseudomonas sp. (PS2)</i>	<i>Pseudomonas sp. (C10)</i>	<i>Serratia sp. (PTS)</i>	<i>Serratia sp. (BP1)</i>
Ácidos orgánicos (+/-)	+	+	+	+
AIA (+/-)	+	+	+	+
Acetoína (+/-)	+	-	-	-

(-) Prueba negativa; (+) Prueba positiva

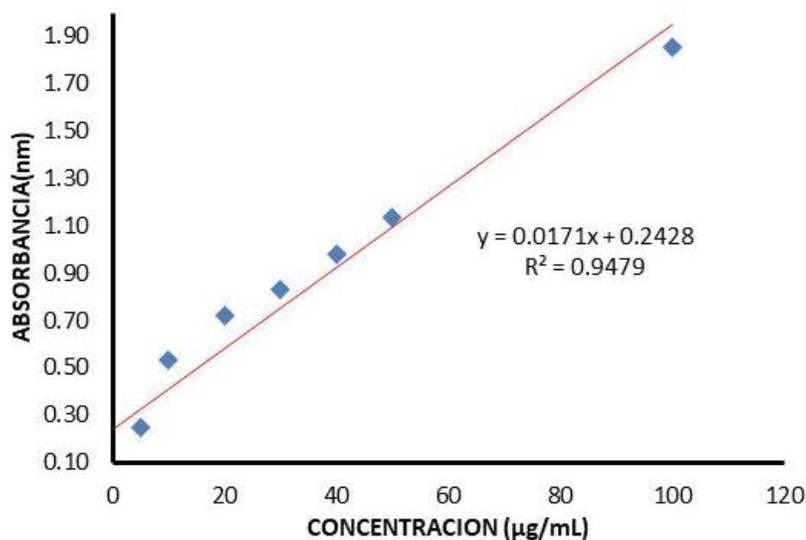
La presencia de acetoína como un compuesto volátil es reportado como un estimulador del crecimiento vegetal (Marín-Loaiza et al., 2007), de igual forma se ha mencionado que pudiese llegar a participar en la resistencia del estrés abiótico (Molina-Romero et al., 2015). Estos resultados explican la actividad de BSF como microorganismos promotores de crecimiento como en la resistencia a fenómenos de estrés vegetal (Pérez-Portuondo et. al., (2017).



**Figura 8** .Reacción colorimétrica de exudados de bacterias solubilizadoras de fosfato en la síntesis de sustancias promotoras del crecimiento (A) Ácidos Orgánicos (B) Acido indol Acético (C) Acetoína.

#### 4.8.- Cuantificación de ácido indol acético (AIA)

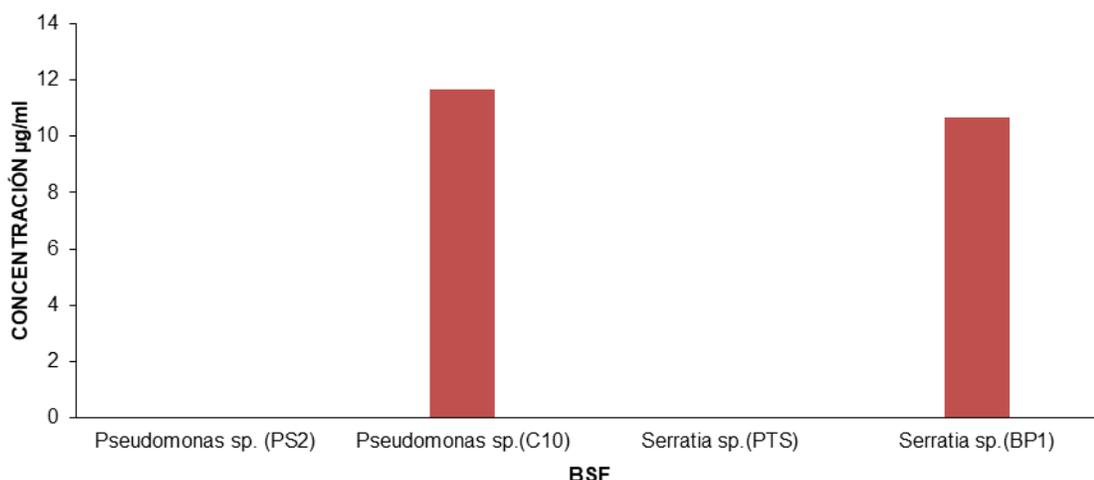
El ácido indol acético producido por microorganismos en caldos de fermentación podría ser una alternativa viable para favorecer la división celular y el incremento de raíz y (Molina-Romero et al., 2015) en una agricultura más sustentable (Castillo et al., 2005), ya que al existir un porcentaje considerable de producción de AIA en la interacción-planta-microorganismo se contribuiría al desarrollo vegetal (Vega-Celeron et al., 2016). Para cuantificar la síntesis de AIA en cada bacteria se realizó inicialmente una curva estándar de AIA utilizando el reactivo de Salkowsky la cual se muestra en la Gráfica 3, mientras que en la Grafica 4 se muestra la capacidad de cada BSF de producir AIA.



**Gráfico 3.** Curva patrón de Ácido Indol Acético con el reactivo de Salkowsky

Aún y cuando inicialmente se detectó capacidad de síntesis de esta hormona, no todas BSF, producen concentraciones elevadas de estas fitohormonas superiores a 5µg/ml de caldo de fermentación. Se observan diferencias de producción significativas particularmente entre los aislados de *Pseudomonas* (C10) y *Serratia* (BP1). Resultados similares han sido obtenidos por Cubillos et al., (2009), quienes estudiaron la capacidad productora *in vitro* de AIA en diferentes cepas bacterianas aisladas a partir de muestras rizosfericas.

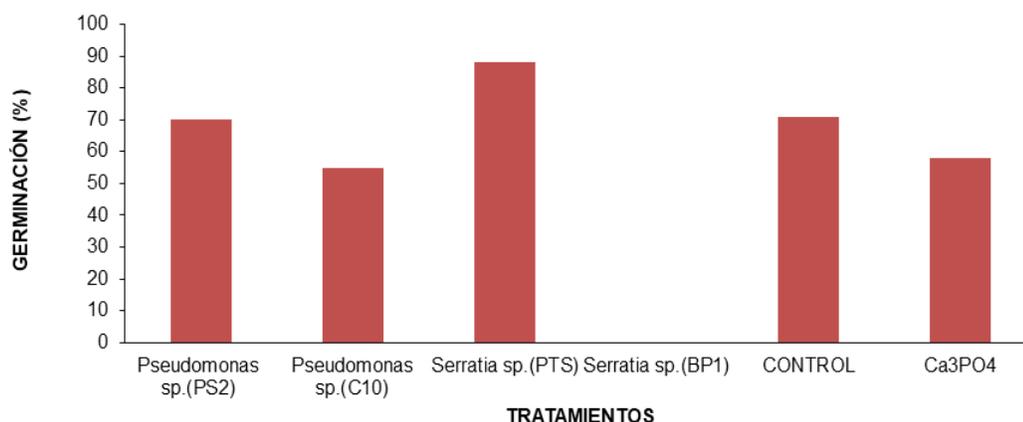
Finalmente, los aislamientos con mayor capacidad para producir AIA también son los que poseen la capacidad para solubilizar fosfatos.



**Gráfico 4.** Cuantificación de AIA en cultivos de BSF.

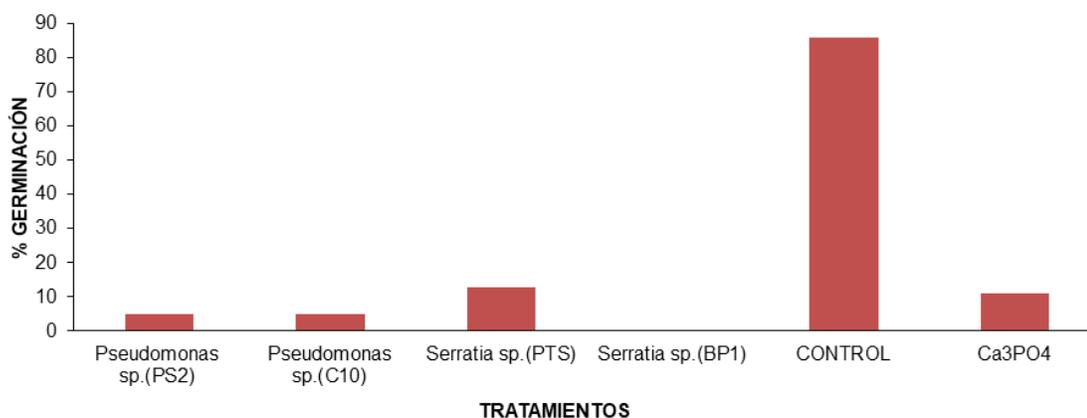
#### 4.9.- Efecto de inoculantes bacterianos en germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum*

La Gráfica 5, ilustra los porcentajes de germinación obtenidos de semillas de tomate. Estos resultados indican que el porcentaje de germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* inoculadas con *Pseudomonas* (PS2) y *Serratia* sp. (BP1) se incrementó hasta un 12% con respecto al tratamiento control. Incrementando el porcentaje de germinación un 20% mayor que el tratamiento con fósforo insoluble ( $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ ). Los resultados son similares a los reportados por Llanos (2017), quien menciona tener valores por encima del 50% de germinación en tratamientos inoculados con bacterias solubilizadoras de fosfatos; Sin embargo, el efecto promotor de germinación al inocular cada bacteria individual en semillas es muy heterogéneo, en algunos casos superior al testigo; pero en otros inferior a la germinación sin inocular BSF.



**Gráfico 5.** Porcentaje de germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* tratadas con BSF.

Por otra parte, en la Gráfica 6, muestra que las semillas de *Capsicum annuum* no mostraron diferencia significativa ( $P= 0.05$ ) en el porcentaje de germinación en comparación al control, aunque el coeficiente de variación en la germinación fue muy amplio. Esto coincide con lo reportado por Cendales et al., (2017), quien menciona que la inoculación de algunas bacterias solubilizadoras de fosfatos en semillas no siempre muestran diferencias significativas en la germinación. En general estos resultados indican que el porcentaje en la germinación dependerá del tipo de cepa y cultivo inoculado.



**Gráfico 6.** Porcentaje de germinación de semillas de *Capsicum annuum* tratadas con BSF

#### 4.10.- Efecto BSF en el crecimiento y desarrollo en *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum*

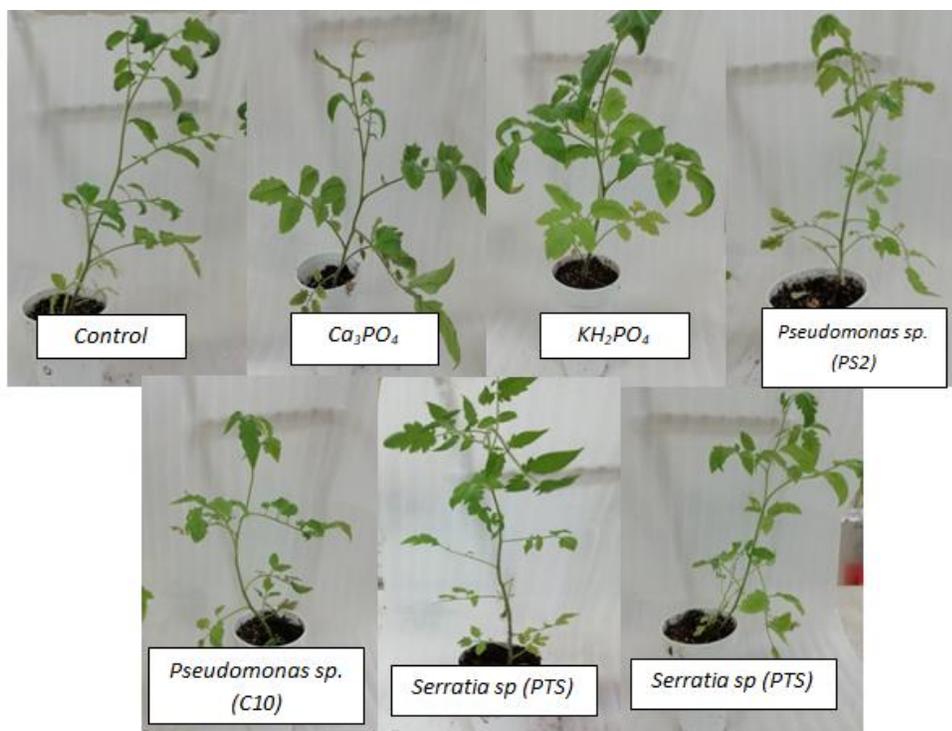
Al evaluar el comportamiento de plántulas de tomate a la inoculación de BSF se muestra en las Tablas 7. Después de 60 días de haber inoculado estos cultivos en maceta se observó que el diámetro del tallo en tomate (Tabla 8) mostró que estadísticamente todos los tratamientos se comportaron similares, no así en el crecimiento de la planta donde la mayoría de los tratamientos con BSF fue superior en altura a las plantas tratadas con fósforo soluble y testigos., En el tiempo de ensayo se comenzó apreciar que la aplicación de algunas BSF inició a promover un mejor desarrollo que los testigos como fue el caso de la BSF. *Serratia sp.*, (PTS) que promovió un mayor número de hojas que en los demás tratamientos. Por otra parte, la mayoría de las variables agronómicas cuantificadas en este ensayo fue notorio apreciar que el desarrollo de plántulas de tomate fue mejor al emplear KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como fertilizante fosfatado soluble universal tal y como se reporta para fertilizantes fosfatados (Vargas et al., 2009), sin embargo, no existen diferencia significativa (P = 0.05) en grosor del tallo, longitud de raíces y altura de planta, donde la aplicación de la mayoría de BSF produjo un número de hojas en plantas significativamente mejor que los testigos, pudiendo estar relacionado este fenómeno a la solubilización del fósforo y la síntesis de AIA, que estas bacterias sintetizan y que se demostró con anterioridad.

**Tabla 7.** Comportamiento de plantas de tomate a la inoculación de BSF bajo cultivo en invernadero.

TRATAMIENTO	DIÁMETRO TALLO (mm)	LONGITUD TALLO (cm)	Nº HOJAS	LONGITUD RAÍZ (cm)	PESO FRESCO (gr)	PESO SECO (gr)
CONTROL	4.06 ± 0.10 a	20.82 ± 2.94 b	43.60 ± 0.92 bc	29.20 ± 2.4 a	16.49 ± 1.47 ab	2.84 ± 0.17 ab
CasPO <sub>4</sub>	3.95 ± 0.13 a	25 ± 2 ab	37.40 ± 1.07 c	24 ± 0.63 a	16.78 ± 1.29 ab	2.24 ± 0.27 b
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.20 ± 0.18 a	28.80 ± 2.22ab	52.60 ± 2.85 ab	31.80 ± 1.46 a	21.34 ± 2.28 a	3.24 ± 0.28 ab
<i>Pseudomonas sp.</i> (PS2)	4.06 ± 0.27 a	29.36 ± 1.38 ab	42.20 ± 3.92 bc	22.20 ± 1.56 a	12.78 ± 1.50 b	3.88 ± 0.47 a
<i>Pseudomonas sp.</i> (C10)	3.53 ± 0.03 a	29.04 ± 0.55 ab	47.80 ± 1.15 bc	24.80 ± 1.68 a	13.68 ± 1.01 b	3.26 ± 0.24 ab
<i>Serratia sp.</i> (PTS)	3.74 ± 0.14 a	27.80 ± 3.49 ab	59.40 ± 3.64 a	23.40 ± 2.54 a	13.37 ± 1.18 b	2.92 ± 0.15 ab
<i>Serratia sp.</i> (BP1)	4.15 ± 0.14 a	33.24 ± 1.37 a	46.40 ± 0.81 bc	27 ± 3.4 a	13.28 ± 1.04 b	2.79 ± 0.30 ab

Valores con la misma letra son estadísticamente similares según Tukey ( $\alpha=0.05$ )

La rapidez con la que el fósforo soluble puede ser aprovechado es una limitante del crecimiento en las plantas, sin embargo, la presencia de BSF en el suelo puede ser una variante de mantener soluble y constante este fertilizante, mientras que estarlo añadiendo frecuentemente en riego incrementa los costos del cultivo en campo (Castro et al., 2005), además de que suelos ácidos o alcalinos frecuentemente propician la reacción del fósforo con Hierro, Aluminio y Calcio, lo que inmoviliza el fósforo y su absorción del suelo (Beltrán, 2014). Este ensayo se desarrolló por 60 días y es factible que un experimento con mayor tiempo pudiera invertir las diferencias a favor BSF, dado que su permanencia en suelo permitiría la existencia constante de fósforo soluble en suelo (Criollo et al., 2012).



**Figura 9.** Plantas de tomate tratadas con BSF en cultivo bajo invernadero.

El comportamiento de plantas de chile a la aplicación de BSF se muestra en la Tabla 8, donde se muestran que existe escasa evidencia para considerar que las variables agronómicas cuantificadas muestren diferencias estadísticas

apreciables de su efecto promotor al aplicarse al cultivo, en algunos casos no existen como lo es el diámetro de tallo y el peso fresco, en otras el número de hojas fue estadísticamente mejor en plantas tratadas con BSF (*Pseudomonas* (PS2), *Pseudomonas*(C10) Y *Serratia*(PTS)) y testigos fertilizados, sin embargo en peso seco y longitud de raíz las variables tuvieron amplia variación por lo que estadísticamente se comportan igual al no poderlas estratificar como diferentes. Fue notorio también que el crecimiento en el tratamiento con *Pseudomonas* (PS2), que logra un crecimiento similar al de las plantas tratadas con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $P=0.05$ ). Es factible que las diferencias entre los tratamientos se hubiesen apreciado mejor al dar mayor tiempo de evaluación, puesto que las plantas requerirían de mayor cantidad de fósforo soluble para su crecimiento, dado que en los primeros 60 días las diferencias entre los tratamientos fueron pequeñas y estadísticamente idénticas. Los números en las variables por lo general fueron más altos con fósforo soluble, sin embargo, las diferencias de aplicar BSF en el tiempo del ensayo ya se comenzaban a apreciar en altura *Pseudomonas* (P2S) y número de hojas *Pseudomonas*(C10).

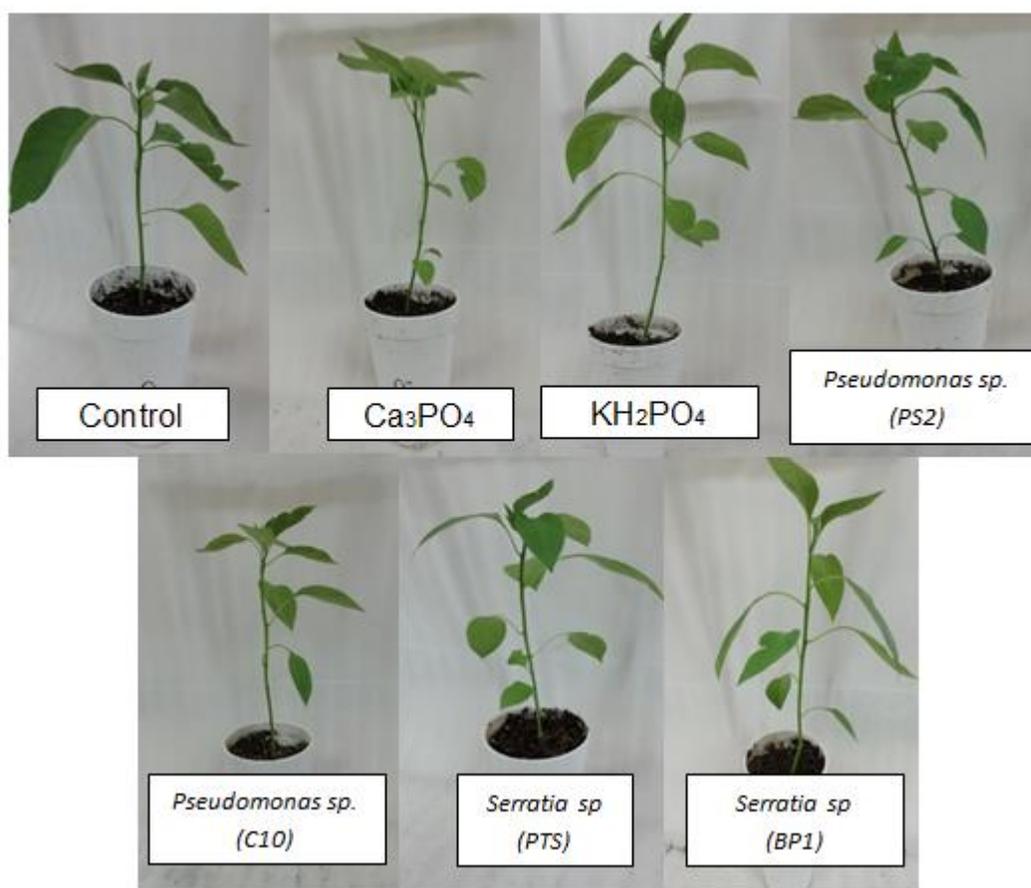
**Tabla 8.** Comportamiento de plantas de chile a la aplicación de BSF en invernadero.

TRATAMIENTO	DIÁMETRO TALLO (mm)	LONGITUD TALLO (cm)	N° HOJAS	LONGITUD RAÍZ (cm)	PESO FRESCO (gr)	PESO SECO (gr)
CONTROL	3.51 ± 0.05 b	23.14 ± 0.39 bc	9.60 ± 0.24 b	19.60 ± 0.67 a	7.60 ± 0.58 b	2.34 ± 0.07 b
Ca <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3.53 ± 0.09 a	25.54 ± 0.75 ab	10.40 ± 0.40 ab	18.92 ± 0.85 a	8.76 ± 0.55 ab	2.50 ± 0.13 b
KHzPO <sub>4</sub>	4.24 ± 0.11 b	27.70 ± 1.56 a	11 ± 0.31 ab	19.62 ± 0.68 a	11.14 ± 0.93 a	3.21 ± 0.17 a
<i>Pseudomonas</i> sp.(PS2)	3.38 ± 0.09 b	28.38 ± 0.28 a	12.40 ± 0.50 a	18.36 ± 0.74 ab	7.81 ± 0.64 b	2.33 ± 0.13 b
<i>Pseudomonas</i> sp.(C10)	3.71 ± 0.11 b	21.32 ± 0.76 c	12.40 ± 0.67a	15.54 ± 0.71 bc	6.99 ± 0.28 b	0.70 ± 0.11c
<i>Serratia</i> sp.(PTS)	3.58 ± 0.14 b	22.66 ± 0.26 bc	12 ± 0.24 ab	14.86 ± 0.82 c	7.98 ± 0.39 b	0.82 ± 0.11 c
<i>Serratia</i> sp.(BP1)	3.41 ± 0.13 b	22.86 ± 1.14 bc	11.20 ± 0.20 abc	14.18 ± 0.58 c	6.21 ± 0.66 b	0.7 ± 0.06 c

Valores con la misma letra son estadísticamente similares según Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

El vigor aparente de las plantas de chile tratadas se presenta en la Figura 10, donde se percibe que todos los tratamientos se comportan con muy poca variación y por lo que a simple vista no se distinguen cambios sustanciales. En la investigación realizada por Reyes et al., (2014), entre los 30 y 60 días no se muestran resultados significativos en los diferentes parámetros agronómicos, lo

cual se cree que es por el tiempo que tardan el microorganismo en colonizar y adherirse al tejido radicular. Otro estudio reporta que la acción de BFS no solo depende de la absorción de nutrientes, sino también de factores ambientales y la dinámica de solubilización de fósforo en el tiempo, ya que el conjunto de estos influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Sánchez et al., 2014). Es factible también que la adaptación de las BSF no lograsen adaptarse completamente a los cultivos ya que fueron aisladas de rizosfera de zacates (gramíneas) y no solanáceas como es el caso del tomate, por lo que la adaptación pudiera requerir mayor tiempo.



**Figura 10.** Plantas de chile tratadas con BSF en cultivo bajo invernadero.

## CONCLUSIÓN

Se aislaron cuatro cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos, a partir de *Bromus carinatus* y *Muhlenbergia macroura*. Dos de ellas identificadas morfológicamente y molecularmente en el género *Pseudomonas* sp., y dos en género *Serratia* spp.

Dos aislamientos *Pseudomonas* (C10) Y *Serratia* sp. (BP1) se destacan por su eficiencia para solubilizar fosfatos, además de tener capacidad de producir auxinas, ácidos orgánicos y acetoína.

La aplicación de BSF *Pseudomonas* (PS2) y *Serratia* (BP1) en plantas de *Solanum lycopersicum* promueven favorablemente la altura y número de hojas, mientras que *Capsicum annuum* la aplicación de *Pseudomonas* (PS2) favoreció el crecimiento de la planta, además todos los aislamientos fueron promotores de un mayor número de hojas en ambos cultivos.

Los zacates nativos pueden ser un reservorio de bacterias solubilizadoras de fosfatos y promotoras del crecimiento vegetal para el estudio y la elaboración de biofertilizantes microbianos.

## REFERENCIAS

- Abdel-Aziez, S. M., Eweda, W. E., Girgis, M. G. Z., y Ghany, B. F. A. (2014). Improving the productivity and quality of black cumin (*Nigella sativa*) by using *Azotobacter* as N<sub>2</sub> biofertilizer. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1), 95-108.
- Acosta, I. H. (2019). Estudio y tendencia en minerales de fosforita para fertilizante. *INFOMIN*, 8(1): 59-64. <http://www.cipimm.co.cu/revista-info/descargas/1-2016/9-COMUNICACION%20CORTA%20DE%20PROPIEDAD%20INDUSTRIAL%20p.p.59-64.pdf> (Consultado 24/02/2019)
- Aguirre-Joya. Gallegos, A. C. F., González, V., Aguilar, C. N., & Herrera, R. R. (2014). Biofertilizantes microbianos. Plaza y Valdés, SA de CV p 15-24
- Álvarez-López, Claudia, Osorio-Vega, Walter, Díez-Gómez, María Claudia, & Marín-Montoya, Mauricio. (2014). Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 226-241 .  
[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1659-13212014000200002&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212014000200002&lng=en&tlng=es).
- Andrés, J. A., Domínguez, D. M., Rojo, R. A., Giménez, M. J., Autrán, V. A., Guiñazú, L. B., & Bruno, C. V. (2019). Solubilización bacteriana de fosfatos y ensayos de inoculación de alfalfa en condiciones de invernáculo. *Ab Intus*, 2(3).
- Anzuay, M. S., Angelini, J. G., & Taurian, T. (2017). Efecto de inoculantes biológicos sobre la comunidad bacteriana rizosférica y el crecimiento de plantas de maní y maíz. *Agrotecnia*, (25), 34
- Armenta-Bojórquez, A. D. A., Gutiérrez, C. G., Báez, J. R. C., Sánchez, M. Á. A., Montoya, L. G., & Pérez, E. N. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo*

sostenible, 6(1), 51-56 <http://uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-16articulosPDF/07%20Biofertilizantes.pdf> (consultado: 18/05/2020)

Becerra, J. M., Quintero, D., Martínez, M., & Matiz, A. (2011). Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 186-194.

Beltrán P. M. E.. (2014). Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-87062014000100009&lng=en&tlng=en.fernandez](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-87062014000100009&lng=en&tlng=en.fernandez) 2013 (Consultado: 21/08/2019)

Bobadilla H. C., y Rincón Vanegas, S. C. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Tesis Licenciatura, especializada en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Pp. 97

Brito, J. E., & Ulla, E. L. (2012). Microorganismos solubilizadores de fosfato en dos regiones agroecológicas de la provincia de Tucumán. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 32(1-2), 31-40.

Carruthers, Steven. Fósforo: deficiencia y toxicidad. *Practical Hydroponics and Greenhouses*. 2017. 175, 5456. Recuperado de: <https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=580136004349654;res=I-ELENG> > ISSN: 1321-8727. (Consultado: 21/11/2019).

Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez Bravo, J., y Acosta Echevarría, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de biología*. 27(137-142).

Castro, L., y Melgar, R. (2005). Rocas Fosfóricas. Capítulo Introductorio. *Minerales para la Agricultura en Latinoamérica*. *Minerales para la agricultura en Latinoamérica*. CYTED. Buenos Aires, Argentina. Pp. 39-61.

- Castro Gil, H. C. (2013). Selección in vitro de cultivos rizobianos que promueven la germinación de semillas de *Lactuca sativa* "lechuga". Tesis Licenciatura, especializada en Biología. Universidad nacional de Trujillo. Trujillo, Peru. Pp 98
- Cendales, T. C., González, C. A. R., Cuásquer, C. P. V., Alzate, O. A. T., & Rodríguez, A. H. (2017). Efecto de *Bacillus* sobre la germinación y crecimiento de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L). *Acta Biológica Colombiana*, 22(1), 37.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41.
- Cisneros-Rojas, C. A., Sánchez-de Prager, M., & Menjivar-Flores, J. C. (2017). Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 149-158.
- Cores Rodríguez, S., & Scarzella, A. (2016). Identificación del agente causal del tallo hueco en tomate en Uruguay. Tesis de Licenciatura, Especializada en Ingeniero Agronomo. Montevideo, Uruguay. 48p.
- Criollo, C. P. J., Obando, M., Sánchez, L., & Bonilla, R. R. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189-195.
- Cubillos, J. R., Castellanos, D. E., y Argüello, H. (2009). Selección de Microorganismos promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético) a partir de muestras de suelo rizosferico, como primera etapa en el desarrollo de un biofertilizante. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 4(2)
- Cuervo Lozada, J. P. (2010). Aislamiento y Caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Tesis de Licenciatura, especializada en Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Bogota, Colombia. 35 p.

- Corrales R. L.C., Galvez, Z. Y. A., & Burbano, V. E. M. (2015). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas*,12(21), 67-79.
- Dandessa C.y Bacha k. 2018. Review on Role of Phosphate Solubilizing microorganisms in Sustainable Agriculture. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 6(11): 48-55
- Dastager, S. G., y Damare, S. (2013). Marine actinobacteria showing phosphate-solubilizing efficiency in Chorao Island, Goa, India. *Current microbiology*, 66(5), 421-427.
- Duarte Sanmiguel, S. M. (2007). Pruebas de patogenicidad in vitro con microorganismos aislados de palmas afectadas por marchitez letal. Tesis de Licenciatura, especializada en Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Bogota, Colombia.112p.
- Farhan Hafeez, Bilal Ahmad Zafar Amin, Uzair Akbar, Akhtar Iqbal, Faridullah, Muhammad Bilal y Rashid Nazir (2019) Evaluación de la disponibilidad de fósforo en el suelo mediante la introducción de *Psolubilizantes* de nuevas cepas bacterianas y fúngicas de la Baja Himalaya, *Comunicaciones en Ciencia del suelo y la planta Análisis*,50:13, 1541-1549, DOI:[10.1080 / 00103624.2019.1626872](https://doi.org/10.1080/00103624.2019.1626872)
- Fernández, L. A.; Zalba, P., Gómez, M. A., & Sagardoy, M. A. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del suelo (Argentina)* 23(1), pp. 31-37.
- Fernández, María Teresa (2007). Fósforo: amigo o enemigo. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 41(2), 51-57.
- Fixen, P. E. 2009. Reservas Mundiales De Nutrientes Para Fertilizantes1. *International Plant Nutrition Institute*.  
<http://www.ipni.net/publication/ia->

- lahp.nsf/0/1776ED0A007B5FF3852579A0006B1484/\$FILE/Reservas%20mundiales%20de%20nutrientes%20para%20fertilizantes.pdf (consultado 20/03/2019)
- Flores-Zárate, M., Bautista-Cruz, A., Aragón-Cuevas, F., & Martínez-Gallegos, V. (2018). Coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato y su efecto en la germinación y desarrollo del frijol. *Interciencia*, 43(2), 137-143.
- Flórez, L. P. P., y Zumaque, L. E. O. (2019). Capítulo xi: Caracterización de bacterias nativas con potencial biofertilizante aisladas de suelos del departamento de sucre. *Biología Aplicada al Sector Agropecuario en el departamento de Sucre*. CECAR. Sucre, Colombia. Pp. 221-248.
- Galindo C. T.; Sánchez N., J. S., y Polanía, J. (2006). Capacidad solubilizadora de fosfatos de microorganismos rizosféricos asociados a dos manglares del Caribe colombiano. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 153-154.
- Ginés, I., y Mariscal Sancho, I. D. L. (2002). Incidencia de los fertilizantes sobre el pH del suelo. E.T.S.I. Agrónomos (UPM). [https://www.researchgate.net/profile/Ignacio\\_Mariscal-Sancho/publication/44113802\\_Incidencia\\_de\\_los\\_fertilizantes\\_sobre\\_el\\_pH\\_de\\_l\\_suelo/links/56fd1ec908ae8c2a97c10a49.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ignacio_Mariscal-Sancho/publication/44113802_Incidencia_de_los_fertilizantes_sobre_el_pH_de_l_suelo/links/56fd1ec908ae8c2a97c10a49.pdf) (consultado 05/02/2018)
- Giovannini, J. (2013). Estudio cuantitativo del efecto de bacterias solubilizadoras de fósforo sobre las distintas fracciones de este elemento en el suelo. Tesina. Universidad Nacional de La Pampa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Argentina.
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2), 793-796.
- Grageda-Cabrera, O. A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J. J., & Vera-Nuñez, J. A. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(6), 1261-1274.

- Guzmán Rodríguez, L. (2007). Presencia de bacterias fitopatógenas en hortalizas y su relación con la inocuidad alimentaria. Trabajo de Grado, especializada en Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Bogota, Colombia. 112 p.
- Hyland, C., Ketterings, Q., Dewing, D., Stockin, K., Czymmek, K., Albrecht, G., & Geohring, L. (2005). Phosphorus basics—The phosphorus cycle. Agronomy Fact Sheet Series, 12, 1-2.
- Khan, M. N., Mohammad M., Zahid A., y Alamri, S. A. (2018). Fertilizers and their contaminants in soils, surface and groundwater. Encyclopedia of the Anthropocene, 5, 225-240.
- Kim, K. Y., Jordan, D., & Krishnan, H. B. (1997). *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiology letters*, 153(2), 273-277.
- King, E. O.; M. K. Ward; D. E. Raney: 1954 Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. The Journal of laboratory and clinical medicine, 44(2), 301-307.
- Li, B., Boiarkina, I., Young, B., Yu, W., y Singhal, N. (2017). Prediction of future phosphate rock: a demand based model. Journal Environmental Informatics.1, 41-53.
- Liu, Z., Li, Y. C., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J. S., y Zhang, M. (2015). Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. Applied Soil Ecology. 96,pp.217-224.
- Llanos Machaca, M. Y. (2017). Bacterias solubilizadoras de fosfato del género bacillus en suelos de la provincia de el Collao (Puno) y su efecto en la germinación y crecimiento de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) en condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura, especializado en Biología. Universidad Nacional Del Altiplano, Puno, Peru.89p.

- Mahecha Molina, Jorge Gonzalo, Castellanos González, Leónides, & Céspedes, Néstor. (2019). Incidencia y severidad de los síntomas de deficiencia de fósforo en el cultivo de fresa en las condiciones de Pamplona, Colombia. *Centro Agrícola*, 46(1), 58-61.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852019000100058&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852019000100058&lng=es&tlng=es).(consultado 20/11/2019)
- Marín-Loaiza, J. C., y Céspedes, C. L. (2007). Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(4), 327-351.
- Martínez, F. E., Sarmiento, J., Fischer, G., & Jiménez, F. (2009). Síntomas de deficiencia de macronutrientes y boro en plantas de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Agronomía Colombiana*. 27(2), 169-178.  
<http://www.scielo.org.co/img/revistas/agc/v27n2/v27n2a05.pdf> (consultado 07/08/2018)
- Matías, P. M. L. Recuperación de Bacterias solubilizadoras de fósforo de rizósfera de *Chloris submutica*, *Deschampsia cespitosa*, *Chloris virginata* y *Setaria adhaerens*. Tesis de licenciatura, especializado en Agrobiología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila México 25-26p
- McGill, W. B., & Cole, C. V. (1981). Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*, 26(4), 267-286.
- Mohammad Saghir Khan, Almas Zaidi, Parvaze A. Wani. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, 2007, 27 (1), pp.29-43.
- Molano, A. (2004). Aislamiento de bacterias biofertilizantes (*Nitrobacter spp*, *Rhizobium spp*, *Azospirillum spp*), para un sistema de compost tipo windrow. *Umbral científico*, (5), 25-32

- Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M. D. R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. E., Santiago-Saenz, Y., Castañeda-Lucio, M., & Muñoz-Rojas, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*, 17(2), 24-34.
- Motsim Billah, Matiullah Khan, Asghari Bano, Tamoor Ul Hassan, Asia Munir & Ali Raza Gurmani (2019) Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture, *Geomicrobiology Journal*, 36:10, 904-916, DOI: [10.1080/01490451.2019.1654043](https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043)
- Munera, G., y Meza, D. (2012). El fósforo elemento indispensable para la vida vegetal. Manual. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia.52p. <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/5248/el%20fosforo%20elemento.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (consultado 12/05/2018)
- Muhammad S., Yasmin, S., Rasul, M., Yahya, M., Atta, B. M., & Mirza, M. S. (2018). Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *Plos one*, 13(9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6150522/>(consultado 17/03/2019)
- Nolla, A., Mari, M. A., Castaldo, J. H., Sorace, M., Neto, L. M., y Damy, C. R. S. (2018). Characterization and potential of organic and mineral phosphate fertilizer used in the annual agriculture. *Scientific Electronic Archives*, 11(3), 6-15. [ea.ufr.edu.br/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=509](http://www.ea.ufr.edu.br/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=509)
- Ober, J.A., Kramer, D. A Searls, J. P. (1999). Fertilizers: Sustaining global food supplies (No. 155-99). US Geological Survey, 155-199.
- Paredes-Mendoza, Marianela, & Espinosa-Victoria, David. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión

crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 61-70.

<https://www.redalyc.org/pdf/573/57316076007.pdf>

Patiño Torres, C. O. (2010). Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca: estudio de biodiversidad y eficiencia. Tesis doctoral, especializada en Ciencias Agropecuarias Línea de Investigación Manejo de Suelos y Agua. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 133p.

Patiño-Torres, C. O., & Sanclemente-Reyes, O. E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10(2), 288-297.

Peñin López, A. (2017). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Trabajo de Grado, especializado en Biología. Universidad De la Laguna. Tenerife, España. 30 p

Pérez-Portuondo, Irasema, Meriño-Reyes, Lidieska, Ábalos-Rodríguez, Arelis, & Pérez-Silva, Rosa María. (2017). Características promotoras de crecimiento vegetal en rizobacterias aisladas de suelos contaminados con compuestos fenólicos. *Revista Cubana de Química*, 29(1), 73-88. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-54212017000100006&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212017000100006&lng=es&tlng=pt). (Consultado 27/11/2019)

Ramírez-Rojas, S., Osuna-Canizalez, F. D. J., García-Pérez, F., Canul-Ku, J., Palacios-Talavera, A., Hernández-Romano, J., & Landa-Salgado, P. (2016). Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas in vitro. *Revista mexicana de fitopatología*, 34(2), 173-183.

Recatume A.H. G. (2016). Participación de óxido nítrico en la eficiencia del uso de fósforo en plantas de trigo. Tesis Licenciatura, especializado en Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de la Plata. Argentina. pp.35

- Rentería Martínez, M. E., Ochoa Meza, A., Guzmán Ortiz, J. M., Barrera Silva, M. Á., Fernández Herrera, E., & Moreno Salazar, S. F. (2019). Actividad in vitro de promoción del crecimiento vegetal y control biológico de rizobacterias aisladas de zacate bermuda ruderal. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(2), 311-324.
- Restrepo-Franco, Marulanda-Moreno G. M., de la Fe-Pérez S., Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 63-76.
- Reyes-Ramírez, Arturo, López-Arcos, Mauricio, Ruiz-Sánchez, Esaú, Latournerie-Moreno, Luis, Pérez-Gutiérrez, Alfonso, Lozano-Contreras, Mónica G., & Zavala-León, Manuel J. (2014). Efectividad de inoculantes microbianos en el crecimiento y productividad de chile habanero (*Capsicum chinense Jacq.*). *Agrociencia*, 48(3), 285-294.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952014000300004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952014000300004&lng=es&tlng=es). (Consultado 30/05/2020)
- Rezakhani, L., Motesharezadeh, B., Tehrani, M. M., Etesami, H., & Hosseini, H. M. (2019). Phosphate-solubilizing bacteria and silicon synergistically augment phosphorus (P) uptake by wheat (*Triticum aestivum L.*) plant fertilized with soluble or insoluble P source. *Ecotoxicology and environmental safety*, 173, 504-513. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.060>
- Rodríguez Heredia, D. (2017). Intoxicación ocupacional por metales pesados. *MediSan*, 21(12), 3372-3385. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1029-30192017001200012&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1029-30192017001200012&lng=es&nrm=iso)
- Rodríguez, H.M .E Rubiano.2002 Aislamiento e identificación de hongos solubilizadores de fosfatos aislados de cultivos de arroz y evaluación del pH y concentraciones de Sacarosa y cloruro de sodio sobre su actividad

- solubilizadora. Trabajo de Grado, especializado en Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.35p.
- Rodríguez-Gámez, O., Aguilera-Rodríguez, I., & Pérez-Silva, R. M. (2013). Adecuación de un micrométodo colorimétrico para la cuantificación de fósforo soluble en cultivos microbianos. *Revista Cubana de Química*, 25(1), 3-8.
- Romero Fernández, A. D. J., Arias Mota, R. M., & Mendoza-Villarreal, R. (2019). Aislamiento y selección de hongos de suelo solubilizadores de fósforo nativos del estado de Coahuila, México. *Acta botánica mexicana*.126 <https://dx.doi.org/10.21829/abm126.2019.1390> (consultado 17/11/2018)
- Sánchez López, D. B., García Hoyos, A. M., Romero Perdomo, F. A., & Bonilla Buitrago, R. R. (2014). Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología*.
- Santa Cruz Achin, P. Y. (2018). Efecto de *Bacillus spp.* aisladas de *Asparagus officinalis* L. en el desarrollo vegetativo de *Solanum lycopersicum* L. "tomate". Tesis de Licenciatura en biología Microbiología-Parasitología.Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Peru.123p.
- SAS Institute inc., JMP®.Administrator's Guide to Anually Licensed Windows and Macintosh Versions. Versions 5. Cary,NC:SAS inc.,. 2002.
- Sashidhar, B., y Podile, A. R. (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Journal of applied microbiology*, 109(1), 1-12. [10.1111/j.1365-2672.2009.04654.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04654.x)
- Scattareggia, J. P. (2016). Aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fósforo de un suelo cultivado con tomate para la industria. Tesis de Licenciatura, especialidad en Ingeniería en Recursos Naturales Renovables. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina.62p.

- Schaad, N. W., Jones, J. B., y Chun, W. (2001). Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (No. Ed. 3). American Phytopathological Society. 373pp.  
<https://my.apsnet.org/ItemDetail?iProductCode=42635>
- Secretaria de economía de México (SE).2018. Perfil de mercado de la fosforita. Dirección General de Desarrollo Minero 4-9.  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/419270/Perfil\\_Fosforita\\_2018\\_\\_T\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/419270/Perfil_Fosforita_2018__T_.pdf) (consultado 03/05/2019)
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., y Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(2), 90-95. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Silva, A. Z., Anderson, F. W., Nowaki, R. H., Cecílio Filho, A. B., & Mendoza-Cortez, J. W. (2017). Síntomas de deficiencia de macronutrientes en pimiento (*Capsicum annum* L.). *Agrociencia Uruguay*, 21(2), 31-43.
- Singh K, V., Lamichhane, J., y Gauchan, D. P. (2018). Strategies to improve phosphorus availability in a sustainable agricultural system. *International Journal Innovative Science and Research Technology*. 3, 323-331.
- Unidad de Planeación Minero Energética (UPME). 2018. CRU consulting. Roca fosfórica caracterización y análisis de mercado internacional de minerales en el corto, mediano y largo plazo con vigencia al año 2035.Las Condes, Santiago, Chile. pp. 50 [http://www1.upme.gov.co/simco/Cifras-Sectoriales/Datos/mercado-inter/Producto%20Cobre\\_FINAL\\_12Dic2018.pdf](http://www1.upme.gov.co/simco/Cifras-Sectoriales/Datos/mercado-inter/Producto%20Cobre_FINAL_12Dic2018.pdf)
- Vargas B. I., Calderón M. L. A., y Pérez T.M. M. (2009). Efecto de las Deficiencias de Algunos Nutrientes en Plantas de Lulo (*Solannum quitoense var. quitoense*) en Etapa de Vivero. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 5(1-2), 64-81.  
<https://doi.org/10.18359/rfcb.2122> (consultado 03/03/2018).

- Vega-Celedón, Paulina, Canchignia Martínez, Hayron, González, Myriam, y Seeger, Michael. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*. 37(Supl.1), 33-39. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362016000500005&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000500005&lng=es&tlng=es). (Consultado 28/01/2020)
- Wyciszkievicz, M., Saeid, A., Chojnacka, K., & Górecki, H. (2015). Production of phosphate biofertilizers from bones by phosphate-solubilizing bacteria *Bacillus megaterium*. *Open Chemistry*, 13(1). 10.1515/chem-2015-0123
- Zapata, F., & Roy, R. N. (Eds.). (2007). Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. Boletín FAO. No.13. Roma, Italia. pp. 177. <http://www.fao.org/3/a-y5053s.pdf> (consultado: 25/06/2019)
- Zhu, F., Qu, L., Hong, X., & Sun, X. (2011). Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of Yellow Sea of China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 615032. 6p doi: 10.1155/2011/615032

## ANEXOS

## Parámetros evaluados

## Diámetro de tallo

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTO	13	3.847176	0.295937	2.3496	0.0139
Error	56	7.053238	0.125951		
C. Total	69	10.900414			

## Longitud de tallo

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTO	13	2786.5069	214.347	13.3510	<.0001
Error	56	899.0640	16.055		
C. Total	69	3685.5709			

## Peso seco

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTO	13	25.678057	1.97524	3.4490	0.0006
Error	56	32.070800	0.57269		
C. Total	69	57.748857			

## Chile diámetro

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTO	13	5.5600800	0.427698	6.0163	<.0001
Error	56	3.9810400	0.071090		
C. Total	69	9.5411200			

## Longitud de tallo chile

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTO	13	375.26194	28.8663	11.4732	<.0001
Error	56	140.89504	2.5160		
C. Total	69	516.15698			

## Numero de hojas

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTO	13	54.34286	4.18022	3.1806	0.0013
Error	56	73.60000	1.31429		
C. Total	69	127.94286			

## Germinación tomate

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Tratamiento	11	750.30556	68.2096	18.8888	<.0001
Error	24	86.66667	3.6111		
C. Total	35	836.97222			

## Germinación chile

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Tratamiento	11	704.30556	64.0278	41.1607	<.0001
Error	24	37.33333	1.5556		
C. Total	35	741.63889			