



**Cinvestav**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

"IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE  
MÚLTIPLES FUENTES DE FOSFATO INORGÁNICO"

**Tesis que presenta**

**L.B.M. Miguel Ángel García Aguilar**

**Para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias**

En la Especialidad de

**Biotecnología de Plantas**

**Director de la Tesis:** Dr. Víctor Olalde Portugal

Irapuato, Guanajuato

Julio 2017

## DEDICATORIAS

- A mis padres por darme la vida, por apoyarme en cada paso que he dado y por ser un orgullo y ejemplo a salir.
- A mi hermana por ser una luz en mi vida y por toda la alegría que me da.
- A mis amigos Eduardo, Juan José, Luis por darme su apoyo y amistad durante todo este tiempo
- A Marisol por apoyarme en este viaje y en los nuevos planes por venir.
- A Ulises, Edgar, Fernando y Daniel por brindarme su amistad estos años y nuevas experiencias en una nueva ciudad.
- A mi familia por apoyarme en mi preparación.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca con la cual puede realizar mis estudios de maestría.

Agradezco a todo el personal y a CINVESTAV Unidad Irapuato por brindarme la oportunidad de seguir con mis estudios y por la dedicación y compromiso frente a sus estudiantes.

Al Dr. Víctor Olalde Portugal por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio, además de todo el apoyo y orientación en la realización del trabajo.

A la Dra. Gabriela Olmedo Álvarez por su asesoría, orientación y apoyo para la realización de mi trabajo de tesis.

Al Dr. Octavio Martínez De La Vega por su asesoría, orientación y apoyo para realizar mi trabajo de tesis.

A María Yolanda Mercedes y Bere del área de cromatografía por su apoyo.

A Rosalinda Serrato por su ayuda en el laboratorio y guía en el laboratorio.

A todo el equipo del laboratorio de Bioquímica Ecológica por su amistad y apoyo durante estos años y por hacer dl laboratorio un lugar tan agradable para trabajar.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN .....	2
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 FÓSFORO EN LO SUELOS.....	4
2.1.1 TIPOS DE FÓSFORO EN LOS SUELOS .....	5
2.2 CICLO DEL FÓSFORO .....	6
2.2.1 INMOVILIZACIÓN .....	9
2.2.2 MINERALIZACIÓN.....	9
2.2.3 PRECIPITACIÓN.....	10
2.2.4 SOLUBILIZACIÓN .....	10
2.3 BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS (BSF) .....	11
2.3.1 PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	14
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	16
3.1 HIPÓTESIS.....	16
3.2. OBJETIVOS.....	16
3.2.1 OBJETIVOS GENERALES .....	16
3.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
4. ESQUEMA DE TRABAJO .....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
5.1 CEPAS BACTERIANAS.....	18
5.2 CULTIVO DE LAS CEPAS.....	18
5.3 ELABORACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MODIFICADO .....	18
5.4 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LAS BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS.....	18
5.5 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LAS BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS .....	19
5.6 IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS POR HPLC.....	20
5.7 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA .....	21
5.8 OBTENCIÓN DE ADN MOLDE .....	22
5.9 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA .....	23
5.9.1 PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN.....	23
5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	24
6. RESULTADOS .....	25

6.1 DESARROLLO DEL MEDIO DE CULTIVO .....	25
6.2 CAPACIDAD CUALITATIVA DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS.....	26
6.3 COMPORTAMIENTO DEL pH Y CAPACIDAD CUANTITATIVA DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS.....	30
6.4 IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS POR HPLC.....	40
6.5 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR.....	43
7. DISCUSIÓN .....	45
8. CONCLUSIONES.....	51
9. PERSPECTIVAS .....	52
10. BIBLIOGRAFÍA.....	53

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura / Tabla	Título	Página
Tabla 1	Formas iónicas del Pi de acuerdo al pH del suelo	5
Tabla 2	Ácidos orgánicos liberados por las BSF	42
Tabla 3	Identificación bioquímica y molecular de las BSF	44
Figura 1	Las diversas influencias en la adquisición de P	6
Figura 2	Ciclo del fósforo	8
Figura 3	Relaciones entre el ciclo del fósforo y los compartimentos orgánicos y minerales	11
Figura 4	Ácidos orgánicos producidos por BSF	14
Figura 5	Condiciones de PCR utilizadas para el gen 16s	23
Figura 6	Medios de cultivo NBRIP-BPB	25
Figura 7	Halos de solubilización para las BSF en fuentes de Pi asociadas a calcio	27
Figura 8	Índices de solubilización para las 9 BSF seleccionadas	28
Figura 9	Halos de solubilización para las BSF en fuentes de Pi asociadas a hierro y aluminio	29
Figura 10	Comportamiento del pH en los diferentes medios de cultivo	31
Figura 11	Comportamiento del pH para el grupo control (-)	32
Figura 12	Concentración de fosforo solubilizado por las BSF	34
Figura 13	Cinética de solubilización para la fuente de fosfato tricálcico	35
Figura 14	Cinética de solubilización para la fuente de fosfato hidroxiapatita	36
Figura 15	Cinética de solubilización para la fuente de fosfato de aluminio	37
Figura 16	Cinética de solubilización para la fuente de fosfato de hierro	38

Figura 17	Comportamiento de solubilización de fosfatos para las BSF	39
Figura 18	Perfil cromatográfico para tres estándares en HPLC	41

## ABREVIATURAS

° C	Grados centígrados	mL	Mililitro
μL	Microlitros	MSF	Microorganismos solubilizadores de fosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico		
ARN	Ácido ribonucleico	N	Normalidad
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales	NBRIP	National Botanical Research Institute's Phosphate growth
BSF	Bacterias solubilizadoras de fosfato		
BUG	Biolog Universal Growth	nm	Nanómetro
dNTP's	Dinucleótido trifosfato	P	Fósforo
FA	Fosfato de aluminio	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
FD	Fosfato dicálcico		
FH	Fosfato de hierro	PDA	Agar papa dextrosa
FM	Fosfato monocálcico	PGM	Microorganismos promotores del crecimiento
FT	Fosfato tricálcico		
g	Gramos	pH	Potencial de hidrogeno
GDH	Glucosa deshidrogenasa	Pi	Fósforo inorgánico
GN-ENT	Gram negativos entéricos	Po	Fósforo orgánico
GN-FAS	Gram negativos fastidiosos	ppm	Partes por millón
GN-NENT	Gram negativos no entéricos	PQQ	Pirroloquinolina quinona
GP	Gram positivos	PVK	Pikosvkaya
H <sup>+</sup>	Protón	rpm	Revoluciones por minuto
HA	Hidroxiapatita	UFC	Unidades formadoras de colonias
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia		
IS	Índice de solubilización		



## RESUMEN

Se evaluaron 230 cepas bacterianas con el objetivo de observar su capacidad como posibles bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) frente a múltiples fuentes de fosfato inorgánico (Pi). Una selección de su capacidad cualitativa en el medio de cultivo NBRIP modificado permitió identificar 9 cepas (*Enterobacter* 1,2,3,4,5,6 y *Pantoea* 1,2,3) con la capacidad de crecer y solubilizar fuentes de Pi asociadas a calcio (fosfato monocálcico, dicálcico, tricálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica), con índices de solubilización entre 1.25 y 2.14 ( $\pm 0.36$ ). A los catorce días después de la inoculación en medio sólido, para los medios de cultivo líquidos se registró una disminución del pH en todos los medios de cultivo inoculados mucho mayor a la observada en el grupo control (-), los ensayos para evaluar la capacidad cuantitativa de las 9 BSF mostraron concentraciones de hasta 1548 L<sup>-1</sup>, 1,699 mg L<sup>-1</sup>, 379 mg L<sup>-1</sup> y 355 mg L<sup>-1</sup> de fósforo soluble para las fuentes de fosfato tricálcico, hidroxiapatita, fosfato de hierro y aluminio respectivamente. Adicionalmente, se detectó la producción de ácidos orgánicos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), siendo el ácido glucónico, acético y oxálico los de mayor presencia en los medios con fosfato tricálcico e hidroxiapatita, y el ácido málico, acético y oxálico en los medios con fosfato de hierro y aluminio. La identificación bioquímica y molecular de las 9 BSF seleccionadas mostró que 6 cepas pertenecen al género *Enterobacter* y 3 cepas al género *Pantoea*, ambos reportados ampliamente como microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM) y solubilizadores de fosfatos (BSF). Los análisis estadísticos con ANOVA mostraron diferencias significativas en el pH ( $p < 0.05$ ) teniendo mayor efecto la cepa (R cuadrado = .951) que el tratamiento (R cuadrado = .937), entre los medios con las fuentes de fosfato de hierro y aluminio no se observaron diferencias significativas ( $p = .536$ ), en el caso del fósforo soluble también se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) teniendo mayor efecto el tratamiento (R cuadrado = .970) en el caso de la presencia de ácidos orgánicos el ANOVA de Friedman y test G mostraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) para los diferentes ácidos orgánicos detectados y el coeficiente de asociación V de Cramer mostró el coeficiente más alto para la variable día.

**Palabras clave:** fósforo (P), bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF), ácidos orgánicos, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), fosfato de hierro, fosfato de aluminio.

## ABSTRACT

230 bacterial strains were evaluated to observe their capacity as potential phosphate solubilizing bacteria (PSB) against multiple sources of inorganic phosphate (Pi). A selection of their qualitative ability in culture medium modified NBRIP allowed identifying 9 strains (*Enterobacter* 1, 2, 3, 4, 5, 6, and *Pantoea* 1, 2, 3) with the ability to grow and solubilize sources Pi associated Calcium (monocalcium, dicalcium, tricalcium, hydroxyapatite and phosphoric rock), with solubilization index between 1.25 and 2.14 ( $\pm 0.36$ ). For liquid culture medium a pH decrease was registered in all inoculated culture media, assessment the quantitative capacity of 9 BSF showed concentrations up to 1548 mg L<sup>-1</sup>, 1.699 mg L<sup>-1</sup>, 379 mg L<sup>-1</sup> and 355 mg L<sup>-1</sup> of soluble phosphorus sources for tricalcium phosphate, hydroxyapatite, iron phosphate and aluminum respectively. In addition, the production of organic acids was detected by high-performance liquid chromatograph (HPLC), with gluconic acid, acetic acid and oxalic acid as major organic acids in the media with tricalcium phosphate and hydroxyapatite and malic, acetic and oxalic acid in the media with iron and aluminum phosphate. Biochemical and molecular identification of selected BSF showed that six strains belong to the genus *Enterobacter* and 3 strains the genus *Pantoea*, both widely reported as growth promoting microorganisms plant (PGPM) and phosphate solubilizers (BSF). ANOVA statistical analysis showed significant differences in pH ( $p < 0.05$ ) having greater effect strain (R squared = 0.951) than treatment (R squared = 0.937), between media sources aluminum and iron phosphate were no significant differences ( $p = .536$ ), in the case of solubilized phosphorus, significant differences were also observed ( $p < 0.05$ ), with a higher treatment effect (R squared = .970), with respect to the presence of organic acids Friedman's ANOVA and G test showed significant differences ( $p < 0.01$ ) for the different organic acids detected and the Cramer V association coefficient showed the highest coefficient for the day variable.

**Keywords:** phosphorus (P), phosphate solubilizing bacteria (PSB), organic acids, high performance liquid chromatography (HPLC), iron phosphate, aluminum phosphate.

# 1. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es el segundo elemento más importante para el correcto desarrollo de las plantas, donde juega un papel esencial en procesos de liberación y acumulación de energía, principalmente <sup>1,2</sup>, aunque también cumple un papel muy importante en la síntesis de proteínas, y forma parte de macromoléculas como son los ácidos nucleicos y fosfolípidos <sup>3,4</sup>, e inclusive del ácido teicoico, en bacterias Gram positivas. Los mayores depósitos de dicho elemento son las rocas y se ha reportado que más del 90% del P total en el sistema suelo-planta-animal se encuentra en el suelo y menos del 10% en los sistemas biológicos restantes, esto debido principalmente a: su relativa escasez edáfica, insuficiencia de fuentes naturales, falta de reposición natural, baja movilidad, y una elevada retención por parte de la matriz del suelo <sup>5</sup>. Por ello en agricultura la mayoría de los casos se debe de suministrar este elemento en forma de fertilizantes químicos para aportar el requerimiento necesario a los cultivos <sup>6</sup>, sin embargo, en la mayoría de los casos hay una pérdida excesiva del P ya sea por procesos de fijación, erosión del suelo, flujo terrestre o procesos de lixiviación, además de que el uso excesivo de dichos fertilizantes provoca problemas ambientales como es la eutrofización de mantos freáticos, lagos y arroyos <sup>7</sup>. En los últimos años se ha vuelto relevante el estudio de ciertos microorganismos benéficos para las plantas llamados microorganismos promotores del crecimiento vegetal o PGPM por sus siglas en inglés (plant growth promoting microorganisms) <sup>8</sup>. Como su nombre lo señala, estos microorganismos pueden afectar el crecimiento de las plantas ya sea de una forma indirecta disminuyendo o previniendo daños por agentes fitopatógenos, y es por tanto un mecanismo de control biológico o bien de forma directa proveyendo a la planta con compuestos sintetizados por las bacterias, o facilitando la toma de ciertos nutrientes como es el fósforo <sup>9</sup>. En el caso particular del fósforo los microorganismos que cuentan con la capacidad de liberar este nutriente en formas disponibles para las plantas son llamados microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) <sup>10</sup> y dentro de este grupo las bacterias son las más abundantes, que bien pueden ser de vida libre en el suelo o bien establecer relaciones simbióticas con algunas plantas. Dichas bacterias tienen la capacidad de solubilizar el Pi

insoluble a una forma inorgánica soluble disponible para los cultivos y es por esto que estas bacterias son conocidas como bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) <sup>11</sup>. Dentro de los principales mecanismos por los cuales las BSF pueden realizar la solubilización del Pi tenemos producción de ácidos orgánicos, quelación, y el intercambio de reacciones <sup>12</sup>, sin embargo se ha reportado que el mecanismo principal es la liberación de ácidos orgánicos al medio extracelular, con la consecuente acidificación del suelo a niveles adecuados para llevar a cabo la solubilización del P <sup>13</sup>. Dentro de los principales ácidos orgánicos producidos por las BSF tenemos a los ácidos glucónico, cítrico, acético, butírico, oxálico, 2-cetoglucónico, málico, entre algunos otros <sup>14</sup>, siendo el ácido orgánico más reportado y al cual se le ha dado mayor importancia el ácido glucónico. Cabe señalar que se conoce poco acerca de los procesos genéticos, bioquímicos y fisiológicos entorno al papel de los ácidos orgánicos en la solubilización de P <sup>15</sup>.

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas para el siglo XXI es la demanda cada vez mayor de alimentos, con la consecuente aplicación de enmiendas poco amigables con el ambiente con la finalidad de cubrir las necesidades nutrimentales de los cultivos. Dada la gran importancia del fósforo, en la nutrición vegetal limitaciones de este elemento tiene como consecuencias: pobre crecimiento de las plantas, retraso en el tiempo de cosecha, madurez en el desarrollo de la planta, frutos deformados y granos pobremente rellenos. Todo esto conlleva a una disminución en el rendimiento de los cultivos, que junto al alto consumo de fertilizantes genera un gasto que en muchas ocasiones no es recuperado con la cosecha, además de las implicaciones económicas en la mayoría de los casos. Solo de un 10 a 20% del Pi soluble que se aplica en forma de fertilizante será aprovechado por los cultivos, el resto se precipitará como formas insolubles de fosfato tricálcico en suelos alcalinos y fosfatos de hierro o aluminio en suelos ácidos. Además, en la mayoría de los casos hay un exceso en la aplicación de fertilizantes, provocando la pérdida potencial de fósforo por escorrentía, lo cual a su vez puede acelerar procesos de eutrofización en cuerpos de aguas, entre algunos otros problemas ambientales.

Es por ello que en los últimos años se ha vuelto muy importante el estudio de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) las cuales tienen la capacidad de solubilizar el Pi insoluble en formas que las plantas pueden aprovechar, esto mediante la liberación de ácidos orgánicos al medio extracelular con la consecuente acidificación del medio. Hasta el momento el ácido orgánico que se ha reportado con mayor frecuencia es el ácido glucónico, aunque cabe señalar que la mayoría de estos estudios se usan fosfato tricálcico o fuentes asociadas a calcio como fuentes de fosfatos, sin embargo hay estudios que sugieren la identificación de otros ácidos orgánicos producidos por BSF en fuentes de fosfato asociadas a hierro y aluminio, como podría ser en casos de suelos con condiciones ácidas, ya que se sabe son pocos los microorganismos que pueden crecer en estas condiciones.

Es por ello que en el presente trabajo se realizó el estudio de cepas provenientes de diversos lugares de interés agronómico como potenciales BSF, de las cuales, las que finalmente se seleccionaron para su caracterización, fueron identificadas tanto como bioquímica como molecularmente, además se realizó la identificación de los ácidos orgánicos producidos en fuentes de fosfatos asociadas a calcio, hierro y aluminio, para finalmente evaluar su capacidad *in vitro* para la solubilización de fuentes insolubles de Pi. Se pretende de esta forma contribuir en un futuro con prácticas agrícolas más amigables con el medio ambiente y contrarrestar el rápido declive de la calidad ambiental.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 FÓSFORO EN LO SUELOS

A diferencia de otros elementos como el carbono, azufre y nitrógeno, el fósforo no presenta un intercambio de ida y vuelta con la atmósfera, pues este elemento se deposita mayormente en las rocas y suelos, y procede solo de la descomposición de las rocas durante el proceso de meteorización <sup>16</sup>. De acuerdo a lo reportado, el contenido de fósforo en las rocas puede ser de 200 – 5000 mg/kg<sup>-1</sup> con un promedio de 600 mg/kg<sup>-17,18</sup>, aunque otros autores reportan contenidos de 400 a 1200 mg/kg<sup>-1</sup> <sup>19</sup>. El P está presente en suelos en diversas formas: fósforo absorbido (soluble), fósforo orgánico (Po) y fósforo inorgánico (Pi), y la cantidad de fósforo en el suelo se encuentra como P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, aunque la forma en que dicho elemento es absorbido es como anión ortofosfato PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Considerando el pH de la mayoría de los suelos, el fósforo se encuentra como fósforo monobásico H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> y dibásico H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> <sup>20</sup>, la concertación del P soluble va a depender de procesos de mineralización e inmovilización por parte del P orgánico, precipitación y solubilización por parte del P inorgánico, además de un equilibrio entre los procesos de adsorción y desorción, entendiendo a la adsorción como la formación de enlaces químicos entre el P y superficies minerales, y la desorción como la liberación del P de dichas superficies hacia la disolución del suelo <sup>21</sup>, sin embargo la limitada cantidad y movilidad del P soluble en el suelo (0.3 – 3.3 x 10<sup>-13</sup> m<sup>2</sup>/s) <sup>5</sup>, hace que las plantas lo absorban de su entorno en mínimas cantidades, esto conlleva al uso de fertilizantes con el fin de suplir la demanda de los cultivos por dicho nutriente 10 – 30 kg de fósforo por hectárea <sup>22</sup>, aunque en la mayoría de los casos el P soluble aplicado en forma de fertilizante se precipitará como sales que evitan el intercambio catiónico y deterioran la cantidad del mismo <sup>23,24</sup>, además de que la aplicación constante elevará la capacidad de retención dejando un porcentaje de hasta el 90% de residualidad <sup>25</sup>, o bien podría presentarse una clorosis férrica por la insolubilización que sufre el hierro ante excesos de P, la precipitación del P aplicado dependerá principalmente del pH de

suelo ya que en condiciones neutras o alcalinas el P precipitará con cationes como el  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$  y en condiciones ácidas con cationes como el  $Fe^{+2}$  y  $Al^{+2}$  <sup>26</sup>.

### 2.1.1 TIPOS DE FÓSFORO EN LOS SUELOS

En términos de nutrientes para las plantas, podemos encontrar tres formas principales del fósforo: fósforo soluble, fósforo orgánico (Po) y fosforo inorgánico (Pi), de las cuales el absorbido por las plantas es el fosforo inorgánico soluble. La concentración de cada uno dependerá de varios factores como son el tipo de suelo, pH, tipo de cultivo, actividad microbiana, contenido de materia orgánica, así como de las entradas de fertilización <sup>27,28</sup> (Figura1). El Pi es aquel que se encuentra formando parte de minerales como puede ser  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Al^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$ , y bajo condiciones de pH normales la solubilidad de estos compuestos asociados al P presentan el siguiente orden  $Ca-P > Al-P > Fe-P$  <sup>29</sup>, sin embargo, hay más de 200 formas minerales de P en los suelos, siendo las más comunes las apatitas cuya fórmula general es:  $M_{10}(PO_4)_6X_2$  donde M= Ca, Mg, X= F, Cl, OH,  $CO_3^{2-}$ , por ejemplo,  $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$  es fluorapatita <sup>30</sup>, las formas iónicas del Pi van a ser dependientes del pH

Tabla 1. Formas iónicas del Pi de acuerdo al pH del suelo.

Forma iónica del Pi		
pH	Forma iónica	Propiedades
< 3	$H_3PO_4$	Extremadamente reactivo
4 a 6	$H_2PO_4^-$	Soluble en agua, puede ser absorbido por las plantas
6.5 a 7.5	$H_2PO_4^-$ y $HPO_4^{2-}$	Es absorbido en menor medida por las plantas
8 a 10	$HPO_4^{2-}$	Es absorbido en menor medida por las plantas
>10	$PO_4^{3-}$	Solo el fosfato de sodio se encuentra disponible

En el caso del P orgánico, éste se encuentra presente en la materia orgánica que se origina por la degradación microbiana de restos animales y vegetales, siendo un reservorio importante de P inmovilizado, podemos encontrar el Po en tres formas principalmente: fosfolípidos, ácidos nucleicos y fosfatos de inositol, debido a su gran estabilidad el fosfato de inositol (ácido fítico o fitato) almacena más del 50% del Po, los fosfolípidos entre el 1 a 2%, y los ácidos nucleicos alrededor del 2 a 5% del Po total <sup>5,30</sup>.

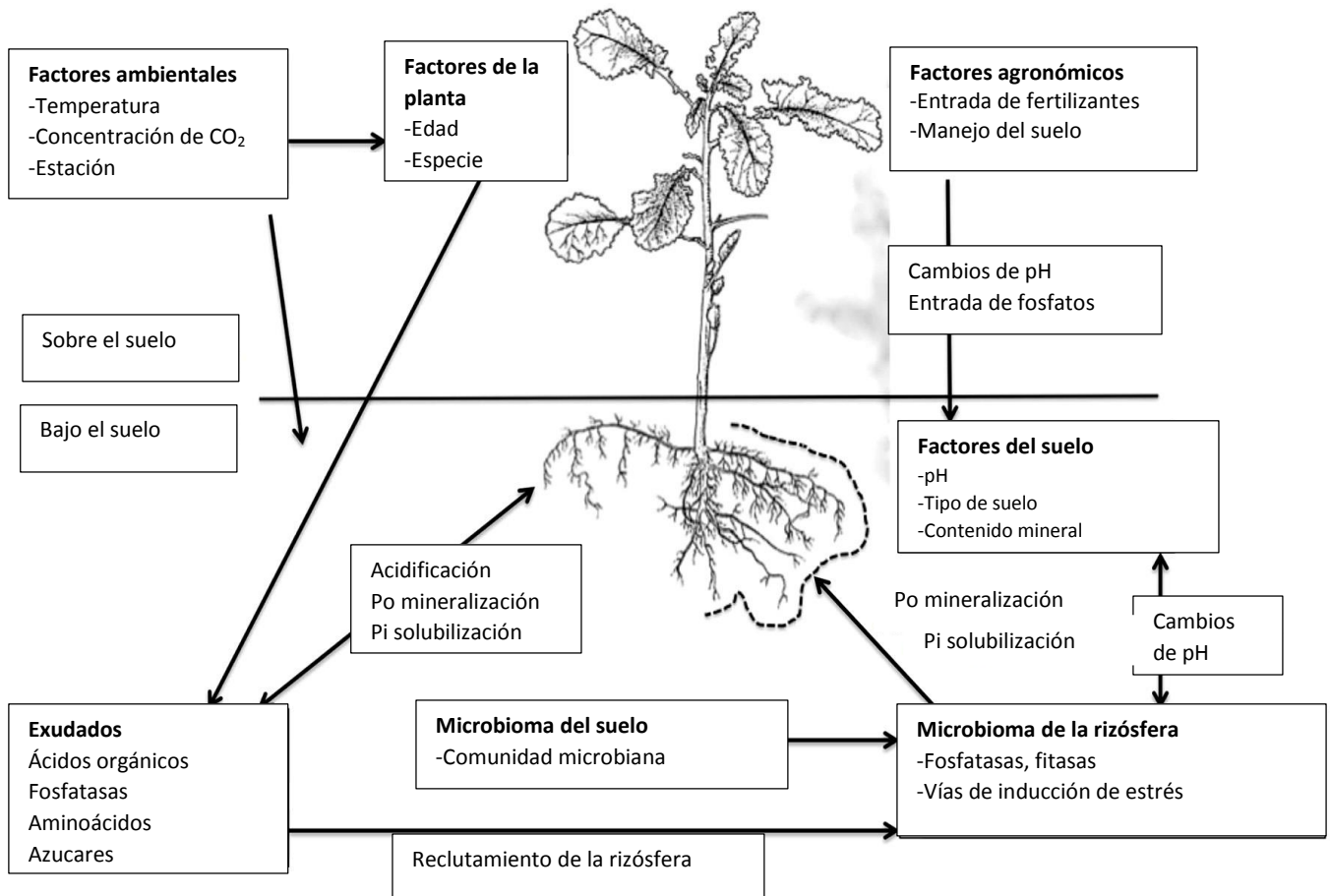


Figura 1. Las diversas influencias en la adquisición de P en los sistemas de raíces de plantas y sus posibles interacciones

27.

## 2.2 CICLO DEL FÓSFORO

A comparación con otros elementos como el nitrógeno que puede incorporarse a los suelos por medio de la fijación bioquímica por parte de microorganismos<sup>31</sup>, en el caso del P esto no sucede, y proviene solo de la descomposición de la roca madre, representando cerca del 0.1% de la corteza terrestre <sup>32</sup>., y es por ello que se dice que es un ciclo cerrado o sedimentario. El ciclo comienza con el fosfato disuelto en la solución del suelo, y la cantidad de P asimilable en la disolución del suelo es muy limitada, alrededor de  $\sim 0.02\text{ppm}$ , dicha concentración está determinada por los procesos de mineralización – inmovilización por parte del Po, y por los procesos de precipitación – solubilización y adsorción- desorción por



parte del  $P_i$  <sup>33</sup>. Las plantas adquieren el P de la solución del suelo en forma inorgánica en estado soluble como fosfatos monobásicos y dibásicos, siendo necesario un pH de 6.5 dado que a ese pH la precipitación de los fosfatos de hierro, calcio y aluminio disminuye <sup>5</sup>, a su vez, los animales lo ingieren al alimentarse de las plantas, por medio de las excretas de los animales y al morir las plantas, parte de este fósforo es liberado en una forma insoluble, sin embargo ciertos microorganismos pueden convertir ese fósforo insoluble a  $P_i$  soluble que puede ser nuevamente captado por las plantas, o bien parte de estos fosfatos son arrastrados al mar por procesos de lixiviación <sup>34</sup>, los cuales descienden al fondo del mar formando depósitos sedimentarios, las corrientes marinas que ascienden desde las profundidades del océano llevan a la superficie cierta cantidad de fósforo que es tomado por las algas, aves marinas y peces, parte de este P regresa a la superficie por medio de la pesca o bien del guano de aves que se alimentan de peces cerrando de esta forma el ciclo <sup>2,35</sup>.

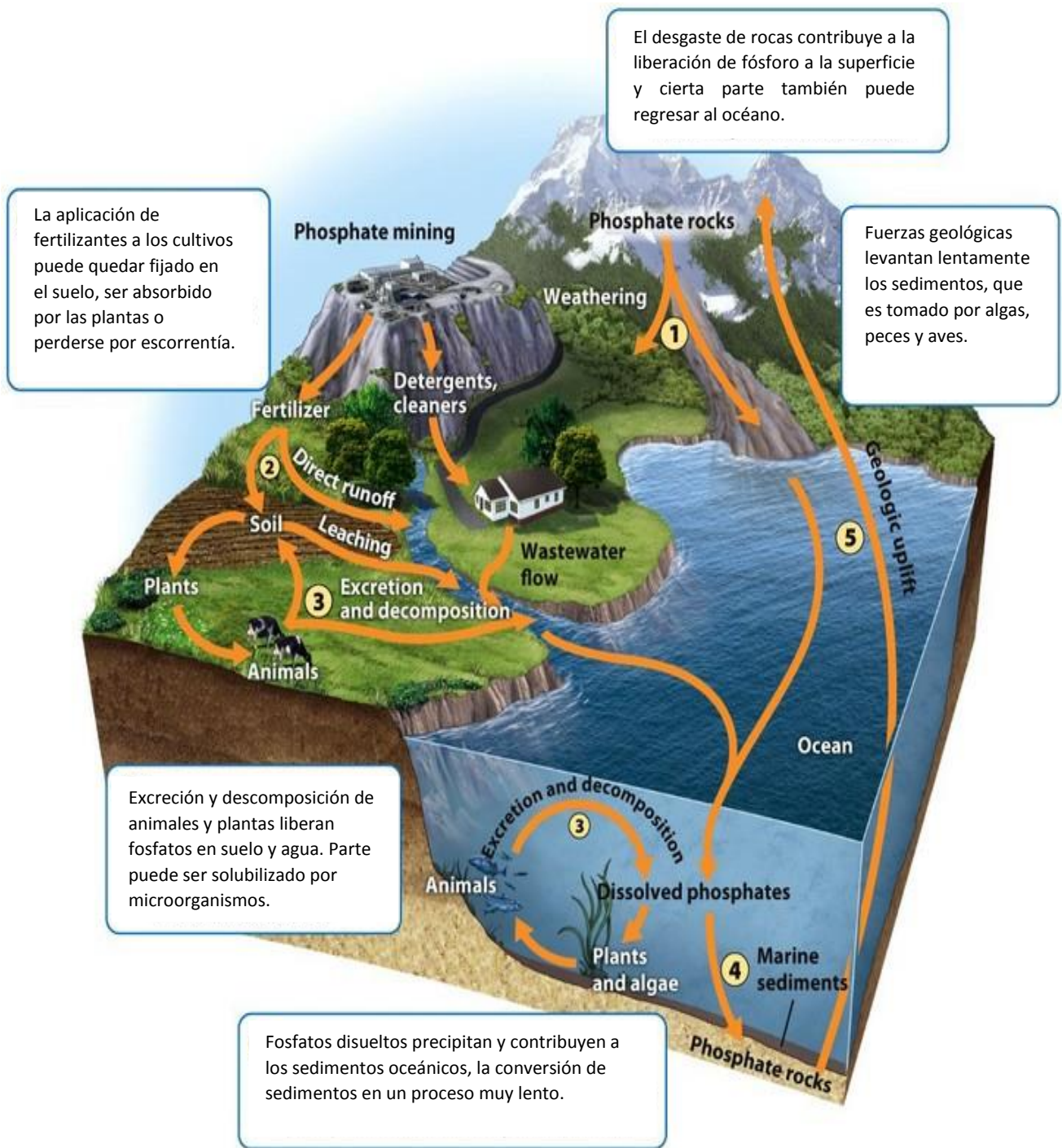


Figura 2. Ciclo del fósforo. Imagen tomada de Clayton School Distric.

### 2.2.1 INMOVILIZACIÓN

Es el proceso por el cual el Pi soluble y disponible para las plantas y microorganismos son consumidos por los mismos, pasando a formas orgánicas no disponibles representadas por la biomasa (figura3), el P puede llegar a formar hasta el 0.5 a 1% de los micelios en hongos y de 1 a 3% de la biomasa bacteriana, la mayor parte del P contenido en los microorganismos se encuentra en el ARN (30-50%), este proceso es dependiente de las demandas de crecimiento de los microorganismos y del contenido de P en los compuestos orgánicos <sup>30</sup>.

### 2.2.2 MINERALIZACIÓN

La solubilización del Po a ortofosfatos ( $H_2PO_4^-$  y  $HPO_4^{2-}$ ) también se le conoce como mineralización, la degradación de los compuestos de Po depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de sus moléculas (figura3). Los fosfolípidos, ácidos nucleicos y fosfatos de azúcar se rompen fácilmente en comparación con los polifosfatos y el ácido fítico que son más difíciles de degradar <sup>36</sup>, la mineralización se ve favorecida a temperaturas termofílicas, pH neutros o alcalinos y a partir de materia orgánica rica en P <sup>30</sup>. Este proceso se puede llevar a cabo por medio de 3 grupos de enzimas: fosfatasas ácidas, fosfatasas alcalinas y fitasas, su liberación se ve estimulada en condiciones específicas como son: disponibilidad de materia orgánica, humus, residuos vegetales y un bajo contenido de P, ya que estos compuestos protegen a las enzimas debido a que cambios bruscos en la temperatura o pH pueden llegar a desnaturalizarlas o inactivarlas <sup>37</sup>, el mecanismo por el cual estas enzimas realizan la solubilización del Po es por medio de la hidrólisis de enlaces éster del Po <sup>38</sup>, en el caso de la fitasa es por medio de la hidrólisis de fitatos contenidos en el ácido fítico <sup>39</sup>, estas enzimas pueden ser secretadas por las raíces de las plantas o bien por algunos hongos y bacterias <sup>27</sup>, aunque cabe señalar que suelos con niveles elevados de Pi pueden inhibir la actividad de dichas enzimas así como la mineralización del Po <sup>40</sup>.

### 2.2.3 PRECIPITACIÓN

El P es un elemento químicamente muy reactivo, por lo cual va a reaccionar rápidamente con iones como el calcio, hierro y aluminio provocando su precipitación <sup>20</sup> (figura3), el Pi es casi siempre predominante, a excepciones como son en suelos donde hay una cantidad elevada de materia orgánica. Como se ha mencionado anteriormente existen más de 200 formas minerales en las que se puede encontrar el Pi, pero en general estos compuestos pueden clasificarse en dos grandes grupos: los que contienen calcio y los que contienen hierro y aluminio, esto depende principalmente del pH del suelo, en condiciones alcalinas o neutras el P precipitará principalmente con  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$ , y suelos ácidos el P precipitará como fosfatos de  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+2}$  o  $\text{Mn}^{+2}$  <sup>17</sup>, entre los compuestos de calcio, los asociados a flúor son los menos aprovechables como es la flúor-apatita, a comparación de los fosfatos monocálcico y dicálcico que son fácilmente asimilables, los fosfatos de hierro y aluminio son fosfatos hidroxilados extremadamente insolubles y muy estables en suelos ácidos <sup>41</sup>.

### 2.2.4 SOLUBILIZACIÓN

El proceso conocido como solubilización consiste en la transformación de formas de Pi insolubles a fosfatos inorgánicos solubles que pueden ser asimiladas por plantas y microorganismos (figura 3), dicho proceso se lleva a cabo principalmente por la producción de ácidos orgánicos, por parte de las raíces de las plantas, o microorganismos como hongos, bacterias y algunos actinomicetos, estos ácidos orgánicos contribuyen a la solubilización del Pi <sup>42</sup>, disolviendo minerales ricos en P o bien quelando los cationes unidos a este elemento como son el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Al}^{2+}$ , desestabilizando el mineral de fosfato y solubilizando el P <sup>14</sup>, sin embargo se ha mencionado que las BSF juegan un papel principal en este proceso ya que son los MSF predominantes a comparación de los hongos y actinomicetos, en el caso de las BSF constituyen aproximadamente del 1 al 50% de la población con dicha capacidad a comparación de los hongos y actinomicetos que constituyen del 0.1 al 0.5% de la población con la capacidad de solubilización <sup>5</sup>, el proceso de solubilización se ve favorecido

en suelos con pH bajos, con bajos contenidos de calcio y un alto contenido de materia orgánica <sup>43</sup>.

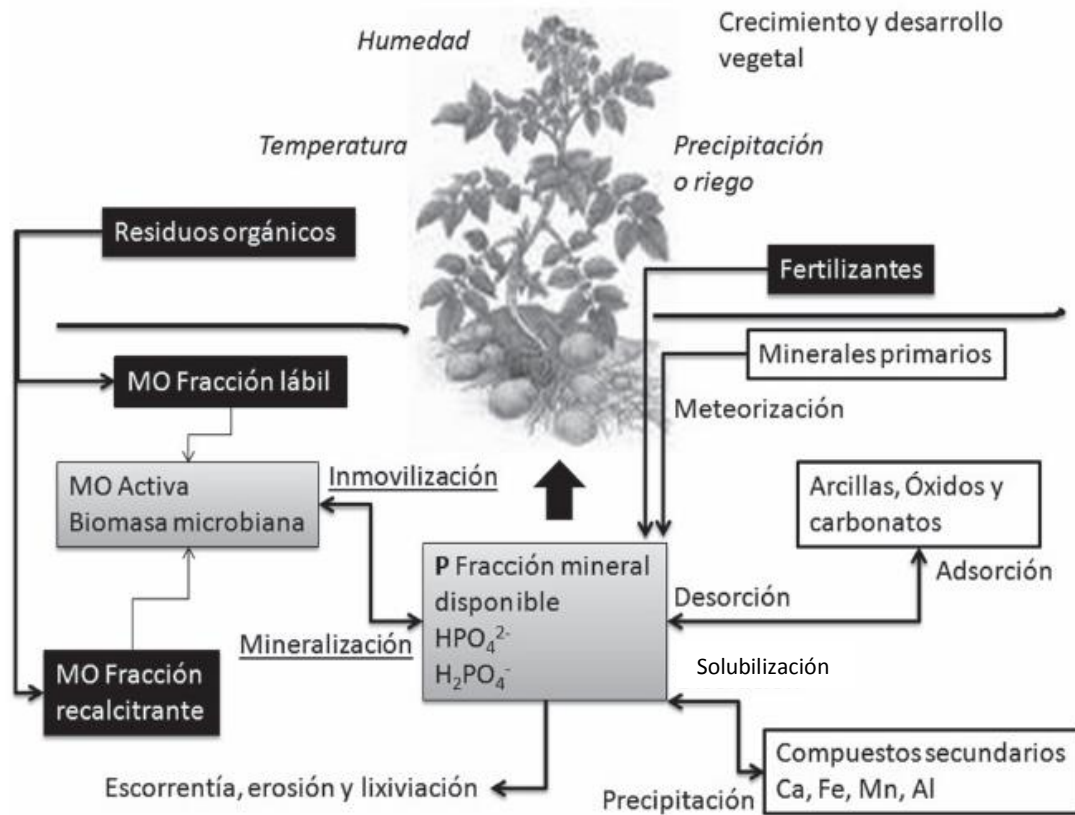


Figura 3. Relaciones entre el ciclo del fósforo y los compartimentos orgánicos y minerales. Los cuadros negros son las entradas al sistema, los grises las fracciones disponibles, sin color las fracciones minerales; sin recuadro procesos y factores que tienen influencia en la disponibilidad de fósforo (MO: Materia orgánica) <sup>44</sup>.

### 2.3 BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS (BSF)

Se conoce como bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) a las bacterias que tienen la capacidad, como su nombre lo indica de solubilizar fuentes de Pi insoluble, dichas bacterias normalmente se encuentran en la rizósfera, ya que la mayoría son capaces, además, de adaptarse, persistir y colonizar la rizosfera, sin embargo, algunas pueden ser endófitas o bien de vida libre <sup>45</sup>. Las BSF pertenecen a un grupo aún más grande de microorganismos conocidos como PGPM <sup>46</sup>, dichas bacterias pueden llevar a cabo la solubilización por medio

de diversos procesos: producción de CO<sub>2</sub>, excreción de protones, asimilación de NH<sup>4+</sup> y la producción de ácidos orgánicos<sup>1</sup>, siendo el último el que se ha reportado como el principal mecanismo microbiológico de solubilización de fosfatos<sup>11,14</sup>. Son diversos los géneros bacterianos que se han reportado hasta el momento como solubilizadores de fosfatos entre ellos encontramos a *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aereobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Kitasatospora*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pantoea*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rahnella*<sup>47</sup>.

En el caso del género *Pantoea*, se compone de bacilos gram negativos, no formadores de esporas, y presentan movilidad por flagelos en disposición peritrica, dicho género puede encontrarse en suelo, agua y plantas, y ha sido reportado como PGPM por su papel en la fijación de nitrógeno, la producción de sideróforos, ácido indolacético (IAA), además de la solubilización de fosfatos<sup>46</sup>. Ensayos con *Pantoea sp.*, en medios de cultivo NBRIP con FT como fuente de fosfatos mostraron una concentración de fósforo solubilizado de 1128 mg L<sup>-1</sup><sup>18</sup>, para *Pantoea dispersa* se reportaron concentraciones de 187-254 mg L<sup>-1</sup><sup>48</sup>, la solubilización fue menor en ensayos con fosfato de hierro y aluminio como fuentes de fosfato en donde se reportan concentraciones de 53 mg L<sup>-1</sup> y 132.33 mg L<sup>-1</sup> para *Pantoea dispersa*.

El género *Enterobacter* se compone de bacterias gram negativas, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, ha sido reportado como PGPM principalmente por tres funciones: síntesis de compuestos para las plantas como son la enzima ACC desaminasa para reducir los niveles de etileno en la raíz, facilitación en la toma de nutrientes principalmente fosfatos minerales y la disminución o prevención de enfermedades<sup>49</sup>. Ensayos con *Enterobacter absuriae* registran concentraciones de fósforo solubilizado de 38 – 510 mg L<sup>-1</sup><sup>50</sup>, en medio de cultivo PVK se ha observado concentraciones de 426 mg L<sup>-1</sup> para *Enterobacter sp.*<sup>13</sup> y 240 mg L<sup>-1</sup> para *Enterobacter cloacae*<sup>47</sup>, en el caso de ensayos usando fuentes de fosfato de hierro y aluminio se ha registrado concentraciones de 89 mg L<sup>-1</sup> y 123 mg L<sup>-1</sup> para *Enterobacter cloacae*.

Se ha mencionado que las plantas le suministran a estas BSF compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento bacteriano, además de que los exudados y detritus vegetales sirven como sustratos energéticos que permiten la actividad microbiológica solubilizadora <sup>5</sup>.

A nivel de laboratorio se ha visto que estas BSF, pueden crecer en medios de cultivo con diferentes fuentes de Pi: fosfato tricálcico, apatita, roca fosfórica, entre otros minerales insolubles, como única fuente de fosfato, además de asimilarlo pueden también solubilizarlo con su consecuente liberación al medio <sup>6,23,42</sup>. Cabe señalar que la mayoría de los medios de cultivos como son el Pikosvkaya (PVK), Sperber y National Botanical Research Institute's Phosphate growth (NBRIP), usan el fosfato tricálcico como fuente principal de P, por lo que otros autores, han propuesto que la utilización del fosfato tricálcico como fuente principal para el aislamiento y evaluación de BSF no es una buena estrategia en especial cuando se seleccionan bacterias usando este compuesto y posteriormente se inoculan en plantas <sup>51</sup>, algunas BSF que solubilizan Pi en condiciones de laboratorio no son capaces de hacerlo en vertisoles alcalinos, esto probablemente al alto nivel de resistencia a los cambios de pH de dichos suelos junto con la baja producción de ácidos orgánicos de la bacterias en estos ambientes <sup>52</sup>, por lo que se ha propuesto usar otras fuentes de Pi o una combinación de dos o tres compuestos metal-P como factor de selección <sup>51</sup>. Otro problema con los medios de cultivo se da cuando se compara la detección de halos de solubilización en medios sólidos y la solubilización de Pi en medios líquidos, esto debido a que se ha reportado que algunas bacterias no producen un halo de solubilización en el medio sólido, pero si son capaces de solubilizar fuentes de fosfatos en medios líquidos <sup>53</sup>, esto se atribuye principalmente a los grados de difusión de los ácidos orgánicos secretados, por ello también se ha recomendado que cuando las bacterias cultivadas no presentan un halo visible después de varios días de inoculación, se debería llevar una prueba adicional en medios de cultivo líquido <sup>22</sup>.

### 2.3.1 PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

Los ácidos orgánicos son compuestos de bajo peso molecular, que provienen del metabolismo de otros compuestos de alto peso molecular como son carbohidratos, péptidos y lípidos <sup>54</sup>, se caracterizan por ser sustancias polares, con la capacidad de formar puentes de hidrogeno entre sí y con el agua, además poseen uno o más grupos carboxilo e hidroxilo, siendo la mayoría compuestos no aromáticos. Dependiendo de sus propiedades de disociación y el número de grupos carboxilo, pueden disolver minerales ricos en fosfatos o bien quelar cationes unidos al Pi liberándolo <sup>8,29</sup> (figura 4).

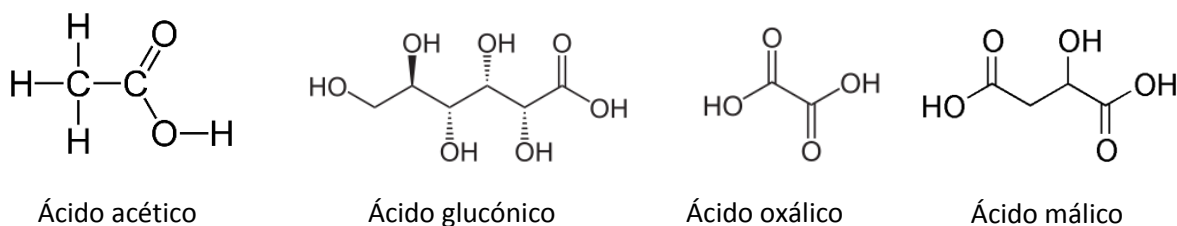


Figura 4. Ácidos orgánicos producidos por BSF.

Diversos ácidos orgánicos se han reportado hasta la fecha como solubilizadores de fosfatos: ácido 2-cetoglucónico, acético, adípico, butírico, cítrico, fórmico, fumárico, glicónico, glucónico, indolacético, láctico, málico, malónico, oxálico, succínico <sup>55</sup>, además se ha reportado que algunas especies como *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, solubilizan fosfatos por medio de la producción de mezclas de ácidos como el ácido láctico, acético, isovalérico e isobutírico <sup>46,56</sup>, dentro de los ácidos orgánicos reportados hasta el momento, el ácido glucónico parece ser el agente más frecuente en la solubilización de fosfatos, lo cual se debe principalmente a la capacidad de dicho ácido de sufrir otras dos oxidaciones formando ácido 2-cetoglucónico y 2,5-dicetogluconico, con la consecuente liberación de un H<sup>+</sup> al medio en cada oxidación, cabe señalar que la mayoría de los ácidos orgánicos son producidos en el periplasma de bacterias gram negativas, por medio de la ruta de oxidación directa de la glucosa y de otros azúcares aldosa reductasa <sup>13,51</sup>. Las enzimas involucradas en la ruta de oxidación directa de la glucosa están orientadas en la cara externa de la membrana citoplasmática, lo que les permite oxidar los sustratos en el



espacio periplásmico, difundiendo así los ácidos orgánicos hacia el espacio extracelular, siendo la principal enzima la glucosa deshidrogenasa (GDH) ya que regula el primer paso de la oxidación directa de la glucosa, el cual se ha mencionado es el principal mecanismo para la utilización de azúcares por los microorganismos, cabe señalar que la GDH solo actúa en presencia de un cofactor quinónico PQQ(2,7,9- tricarboxil-1H-pirrol[2,3-f ]quinolina-4,5-diona), el cual es sintetizado a su vez por la enzima PQQ sintasa <sup>5,18</sup>.

El efecto de solubilización por parte de los ácidos orgánicos se lleva a cabo por la acidificación de la célula microbiana, con la consecuente acidificación del suelo aledaño, además puede llevarse a cabo un intercambio de ácido: por ejemplo, en el caso del ácido cítrico, en el cual los H<sup>+</sup>, provenientes del citrato se intercambian por el P ligado a la superficie de los cristales de Al(OH)<sub>3</sub> o Fe(OH)<sub>3</sub> <sup>5,8,27</sup>.

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESIS

En una colección de bacterias ambientales será posible identificar aquéllas con capacidad de solubilizar diversas fuentes de fosfato inorgánico, y que además sean capaces de producir diversos ácidos orgánicos, en condiciones *in vitro*.

#### 3.2. OBJETIVOS

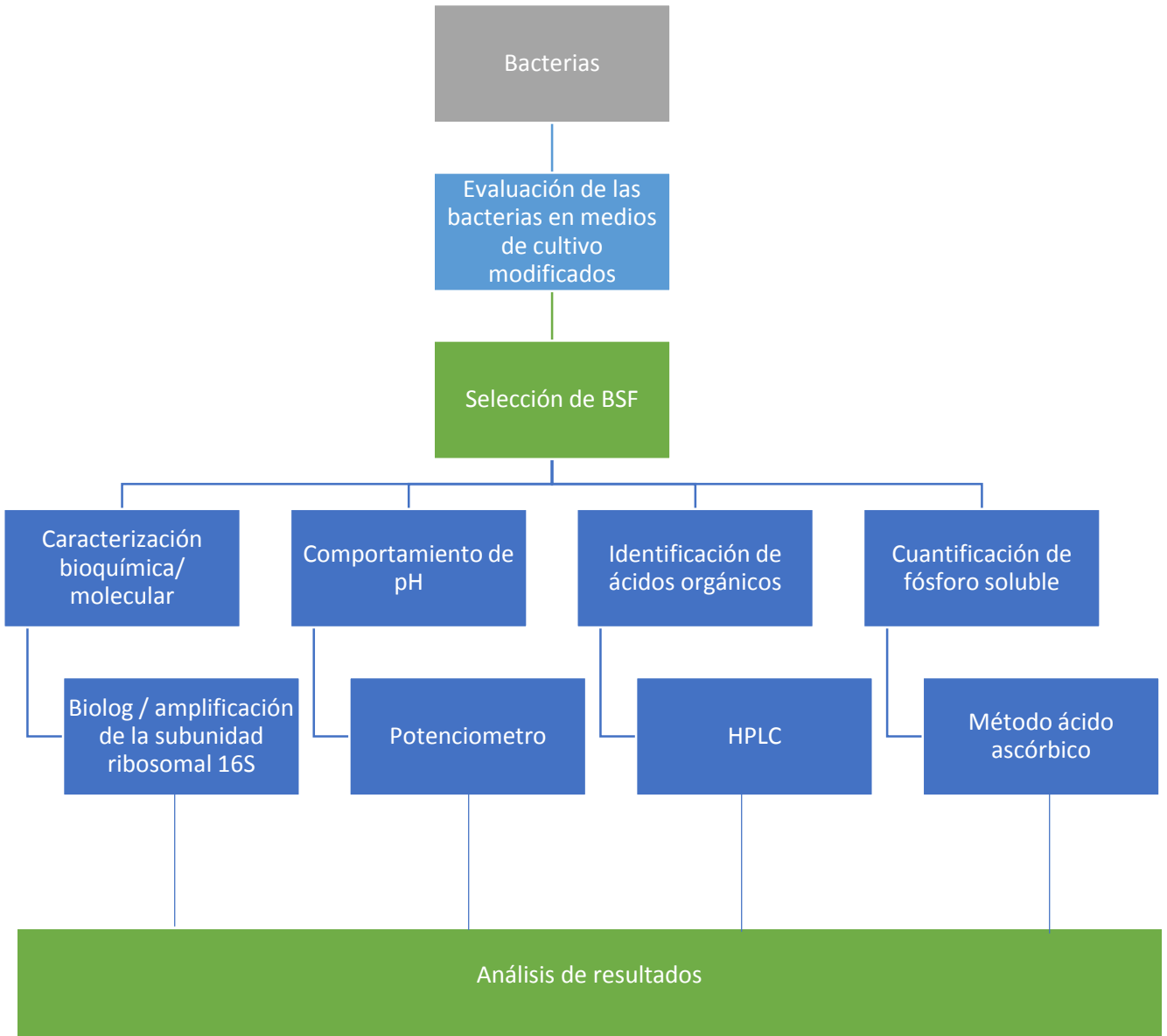
##### 3.2.1 OBJETIVOS GENERALES

- Selección y caracterización de bacterias solubilizadoras de múltiples fuentes de fosfato inorgánico, así como de los principales ácidos orgánicos producidos por dichas cepas.

##### 3.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar medios de cultivo modificados para detectar de forma visual la solubilización de diferentes fuentes de P.
- Selección de cepas solubilizadoras de P.
- Cuantificar la producción de fósforo soluble por las BSF en condiciones *in vitro*.
- Evaluación del pH.
- Identificación de los ácidos orgánicos producidos por las BSF.
- Identificación bioquímica y molecular de las BSF.

## 4. ESQUEMA DE TRABAJO



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 CEPAS BACTERIANAS

Las cepas utilizadas en este estudio, habían sido previamente aisladas de diferentes zonas agrícolas ubicadas en los estados de Guanajuato, Aguascalientes, por parte del laboratorio de bioquímica ecológica (200 cepas), y en el caso de las cepas proporcionadas por el laboratorio de bacteriología molecular (30 cepas), estas provenían de la zona de Cuatro Ciénegas, en el estado de Coahuila, por lo cual se trabajó con un total de 230 cepas.

### 5.2 CULTIVO DE LAS CEPAS

Todas las cepas se cultivaron en medio de agar papa dextrosa o PDA por sus siglas en inglés (Potato Dextrose Agar), en condiciones aeróbicas a  $\sim 30^{\circ}\text{C}$ , agregando  $15\text{ gL}^{-1}$  de agar bacteriológico en el caso del medio sólido, en el caso del medio líquido no se agregó agar bacteriológico y se incubó a temperatura ambiente con agitación constante a 160 rpm.

### 5.3 ELABORACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MODIFICADO

Se decidió usar el medio National Botanical Research Institute's Phosphate growth (NBRIP), bajo la formulación reportada en la bibliografía  $\text{L}^{-1}$ : glucosa- 10 g, fuente de fosfato - 5 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.25g, KCl- 0.2g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0.1g, a excepción de la fuente de fosfato en la que se emplearon: fosfato tricálcico, dicálcico, hidroxiapatita, fosfato de hierro y aluminio, respectivamente, para el caso del medio de cultivo sólido se agregó  $15\text{ gL}^{-1}$  de agar bacteriológico, además también se ensayó con el medio NBRIP-BPB, añadiendo  $0.025\text{ gL}^{-1}$  de azul de bromofenol al medio de cultivo líquido, cabe señalar que en todos los casos se ajustó el pH del medio a 7 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N.

### 5.4 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LAS BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS

La selección preliminar de las BSF se realizó mediante ensayos cualitativos en el medio de cultivo NBRIP sólido modificando la fuente de fosfato, se evaluaron las 230, para ello se

usaron placas Petri, se dividió en 9 secciones cada placa y en cada sección se procedió a inocular una cepa bacteriana por picadura central en el medio de cultivo usando para ello un asa bacteriológica recta, en este ensayo se evaluaron las 230 cepas por triplicado en 6 fuentes de fosfatos: monocálcico, dicálcico, tricálcico, hidroxiapatita, roca fosfórica, fosfato de hierro y aluminio, una vez sembradas se incubaron durante dos semanas a 28 °C, al día 14 se procedió a hacer la medición del índice de solubilización, usando la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{(\text{diámetro de la colonia} + \text{diámetro del halo})}{\text{diámetro de la colonia}}$$

## 5.5 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LAS BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS

Una vez seleccionadas las BSF mediante el método cualitativo se procedió a hacer la determinación cuantitativa de la capacidad solubilizadora de P, para ello se empleó el medio de cultivo NBRIP líquido, y los ensayos se realizaron por duplicado para 9 cepas previamente seleccionadas, usando 4 fuentes de fosfatos: tricálcico, hidroxiapatita, fosfato de hierro y aluminio, se emplearon matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de medio de cultivo NBRIP con la correspondiente fuente de fosfato, cada matraz se inóculo con 1 mL de inóculo bacteriano ( $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>), usando como testigos medios de cultivo sin inocular, una vez inoculados se procedió a incubarlos durante una semana a temperatura ambiente y agitación constante 160 rpm. A fin de medir la concentración de fósforo solubilizado, cada día se tomaba una alícuota de 5 mL en tubos de 15 mL de polipropileno, se centrifugaba a 13 000 rpm (rotor Heraeus #3335) por 20 minutos, posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL y se centrifugó a 13 000 rpm (rotor Heraeus #3331) durante 10 minutos, posteriormente se tomó otra alícuota de 100 µL en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 900 µL de agua tridestilada, se procedió a agitar en vortex para finalmente depositar la muestra en un pozo de una microplaca de 96 pozos, cada pozo contenía 60 µL de muestra, 60 µL de una solución de tartrato de antimonio potasio, molibdato de amonio y ácido

ascórbico, y 180  $\mu\text{L}$  de agua destilada, por lo que el volumen final de cada pozo fue de 300  $\mu\text{L}$ , una vez depositada cada muestra en su respectivo pozo se procedió a hacer la lectura por el método reportado por Chávez 2017, usando un lector de microplacas a una longitud de onda de 880 nm.

Al resto del filtrado se le midió el pH con potenciómetro.

Previamente al ensayo se realizó una solución patrón de 50 ppm de fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ) de dicha solución se hicieron diluciones de 10 ppm hasta 1 ppm en unidades de 0.5 en 0.5 y a partir de la solución de 1 ppm se hicieron otras 10 diluciones en unidades de 0.1 en 0.1, una vez realizadas las diluciones se procedió a hacer una curva de calibración  $y=39.227x-5.3616$ ,  $R^2=0.9926$ , que permitió establecer la relación entre la absorbancia y la concentración de P soluble (ppm).

Las soluciones que se utilizaron fueron las siguientes:

- Solución estándar de molibdato de amonio (Sigma): se preparó disolviendo 12.7 g de la sal en 250 mL de agua destilada.
- Tartrato de antimonio potasio (Sigma): se preparó disolviendo 0.291g en 100 mL de agua destilada.
- Ambos reactivos fueron añadidos a 500 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 N, y almacenados en un recipiente de vidrio Pyrex® en un compartimiento oscuro.
- Reactivo revelador de color: el ácido ascórbico (Sigma) fue preparado disolviendo 2.625 g en agua destilada y diluido a 250 mL.

El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio reaccionan en medio ácido con el ortofosfato para formar un heteropoliácido: ácido fosfomolibdico, que es reducido por el ácido ascórbico a un complejo azul de molibdeno intensamente coloreado; sólo las formas de ortofosfato forman dicho color azul en esta prueba.

## 5.6 IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS POR HPLC

Se realizó la identificación de los ácidos orgánicos para las 9 BSF previamente seleccionadas, para ello se empleó el medio de cultivo NBRIP modificado con las siguientes fuentes de fosfato: monocalcico, tricalcico, hidroxapatita, fosfato de hierro y aluminio, todos los ensayos se realizaron por duplicado, el medio de cultivo se preparó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, que contenían 100 mL del medio NBRIP con la correspondiente fuente de fosfato, cada matraz se inoculó con 1 mL de inóculo bacteriano ( $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>), usando como testigos medios de cultivo sin inocular, posteriormente se incubaron durante 5 días a temperatura ambiente y en agitación constante 160 rpm, cada día se tomó una alícuota de 10 mL, la cual se centrifugó a 13 000 rpm (rotor Heraeus #3335) durante 5 minutos, posteriormente se tomó el sobrenadante y se pasó por un filtro Millipore® con un tamaño del poro de 0.45µm, de este filtrado se tomaron 200 µL con una micro pipeta y se depositaron en viales de HPLC de 1.5 mL, que contenían insertos de 0.1mL, la detección de los ácidos orgánicos se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la detección se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención de los estándares usados: ácido oxálico, butírico (Kem), succínico, glucónico, glicólico, láctico (Sigma), acético (Fermont), cítrico, málico (J.T Baker), y los tiempos de retención correspondientes a los picos obtenidos en el cromatograma para cada muestra.

## 5.7 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Para la caracterización bioquímica de las BSF se empleó las microplacas GN2™, siguiendo las especificaciones y condiciones de cultivo indicados en el manual de BIOLOG®.

- Paso 1- Inocular cultivo puro en medio de agar BUG (Biolog Universal Growth).
- Paso 2- preparación de la muestra y caracterización.
  - Tinción de gram para confirmar que se trata de una bacteria gram negativa
  - Observar morfología celular: cocos o bacilos.
  - Caracterizar la bacteria en uno de los siguientes grupos: no entéricos (GN-NENT), entéricos (GN-ENT), o fastidiosos (GN-FAS).
  - Esto determinará el protocolo apropiado de la bacteria y preparación del inóculo.

- Paso 3-preparación del inóculo
  - Ajustar la turbidez apropiada para el caso de bacterias GN-ENT 61%T
  - Usar fluido de inoculación GN/GP-IF + tioglicolato

Una vez preparado el inóculo se depositaron 150  $\mu$ L en cada pozo para ello se usa una micropipeta multicanal, y se deja incubar a 35-37°C en condiciones aeróbicas de 4-6 horas o 16-24 horas, posteriormente se realizó la lectura de las microplacas GN2™, con el sistema MicroLog M.

## 5.8 OBTENCIÓN DE ADN MOLDE

El ADN de las BSF se obtuvo mediante la técnica modificada de Harwood y Cutting (1990), de un cultivo en medio PDA del cual se obtuvo una pastilla microbiana con una centrifuga a 13 000 rpm (rotor Heraeus #3331) durante 5 minutos, a las pastillas resultantes se le agregó 150  $\mu$ L de regulador de lisis (0.1M NaCl; 50mM EDTA, pH 7.5) y 15  $\mu$ L de una solución de N-laurylsarcosine al 20%, agitando vigorosamente con un vortex para completar la lisis, posteriormente se agregó 200  $\mu$ L de fenol frío, se agitó con vortex y se colocó en una centrifuga a 13 000 rpm (rotor Heraeus #3331) durante 5 min, la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5mL, al cual se le agregó 200  $\mu$ L de cloroformo alcohol isoamilico (24:1) frío, se vuelve a agitar vigorosamente con vortex y con una centrifuga a 13 000 rpm (rotor Heraeus #3331) durante 5 min, posteriormente la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL, al cual se le agregó 20  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M, 500  $\mu$ L de alcohol etílico al 70% frío, se incubó a -20°C durante 30 min sin agitar, posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm (rotor Heraeus #3331) durante 5 min y eliminó el sobrenadante, la pastilla obtenida se lavó usando 50  $\mu$ L de alcohol etílico al 70% frío, se agitó y centrifugó a 13 000 rpm (rotor Heraeus #3331) durante 10 min, finalmente la pastilla lavada se resuspendió en 25  $\mu$ L de agua Milli-Q® y se almacenó a -20 °C.



## 5.9 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Las reacciones de PCR para la amplificación del gen 16s se llevaron a cabo en un volumen de 10  $\mu\text{L}$ , el cual contenía: agua (7.55  $\mu\text{L}$ ), 10X DreamTaq (Thermo Scientific) Buffer (1  $\mu\text{L}$ ), desoxirribonucleótidos trifosfatos a 10 mM (0.2  $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido (0.4  $\mu\text{L}$  de cada uno), ADN molde 10 pg-1  $\mu\text{g}$  (0.4  $\mu\text{L}$ ) y 0.05  $\mu\text{L}$  de DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific). Los oligonucleótidos usados corresponden a los oligonucleótidos universales 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y el reverso 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes (figura5).

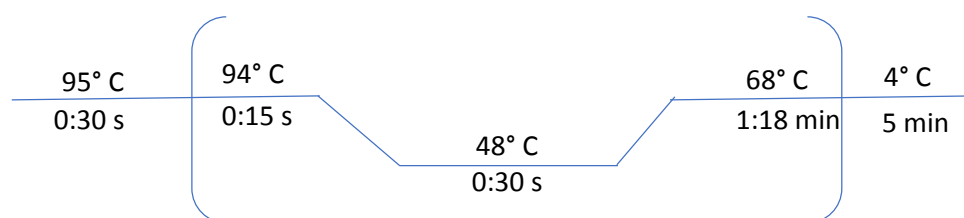


Figura 5. Condiciones de PCR utilizadas para el gen 16s.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con tris-acetato-EDTA 1x (TAE1X), bajo un campo eléctrico de 90 volts, para finalmente tomar una imagen del gel en un fotodocumentador Gel Doc™ XR+System BIO-RAD®.

### 5.9.1 PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Los amplificados obtenidos que correspondían con el tamaño esperado se purificaron mediante el UltraClean® PCR Clean-Up Kit (Mo Bio®), una vez obtenido el amplificado por PCR, se mezcló 5 volúmenes de la solución SpinBind a la reacción de PCR, por ejemplo, para un volumen 100  $\mu\text{L}$  se añaden 500  $\mu\text{L}$ , posteriormente se mezcló por pipeteo, y se transfirió la mezcla PCR/SpinBind a una unidad Spin Filter evitando la transferencia de aceite, posteriormente con una centrifuga de 10-30 segundos a un mínimo de 10 000 rpm (rotor

Heraeus #3331) aunque se recomienda hacerlo a 13 000 rpm, posteriormente se removió la canastilla del Spin Filter y se descartó el líquido a través de decantación, una vez realizado esto se reemplazó la canastilla en el mismo tubo, y se añadió 300 µL de SpinClean® regulador al Spin Filter, se usó centrifuga de 10 – 30 segundos a un mínimo de 10 000 rpm (rotor Heraeus #3331), posteriormente se removió la canastilla y se descartó el líquido por medio de decantación, y se reemplazó la canastilla en el mismo tubo, se usó centrifuga 30 – 60 segundos a un mínimo de 10 000 rpm (rotor Heraeus #3331), se transfirió el Spin Filter a un tubo de colección de 2 mL nuevo y se añadió 50 µL de Elution regulador (10 mM Tris) o agua estéril directamente en el centro de la membrana del Spin Filter, posteriormente se usó centrifuga de 30-60 segundos a un mínimo de 10 000 rpm (rotor Heraeus #3331), se descartó la canastilla, y el ADN estará ahora en el tubo de colección de 2 mL, el ADN se encontrara libre de todo los componentes de reacción como cebadores, sales, dNTP's. Dichos purificados se enviaron a MacrogenUSA Corp, para su secuenciación, una vez obtenidas las secuencias correspondientes se analizaron usando los programas Bioedit, y las herramientas, Nuclie Acid Sequence Massager, Basic Local Alegenment Seach Tool (BLAST) y Multiple Sequence Alignment Clustal/W2.

## 5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos fueron analizados estadísticamente usando el programa SPSS® 2013 (versión 22), se comprobó si los datos cumplían con normalidad y homogeneidad de varianza, los datos fueron analizados por ANOVA y DHS de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) para determinar diferencias significativas entre grupos en el caso de pH y fósforo soluble, para el análisis estadísticos de ácidos orgánicos los datos se analizaron con pruebas no paramétricas, usando el método de ANOVA de Friedman y test G, se empleó la prueba de V Cramer para evaluar el efecto de la cepa, día y tratamiento en función de la ausencia y presencia de los diferentes ácidos orgánicos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 DESARROLLO DEL MEDIO DE CULTIVO

Se ensayaron varias formulaciones partiendo de los medios de cultivo NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth), PVK (Pikovskaya, 1948) y MMSFCP (Medio Mínimo para Solubilización de Fosfato Colegio de Postgraduados), las formulaciones de cada medio fue igual al reportado en la bibliografía, sin embargo se modificó la fuente de fosfato por fosfato monocalcico, dicálcico, tricálcico, roca fosfórica, hidroxiapatita, fosfato de hierro y fosfato de aluminio, respectivamente, de los tres medios de cultivo ensayados, el mayor número de BSF se obtuvo en el medio de cultivo NBRIP con las diferentes fuentes de fosfatos, por lo cual se decidió seguir trabajando en el resto del trabajo con dicho medio de cultivo, cabe señalar que también se realizaron ensayos con medios de cultivo liquido suplementados con el indicador de pH azul de bromofenol (NBRIP-BPB), sin embargo el viraje de color no correspondía al amarillo característico cuando se presenta una disminución del pH del medio (Figura 6), por lo que se decidió seguir empleando el medio NBRIP sin el indicador de pH en los ensayos posteriores.

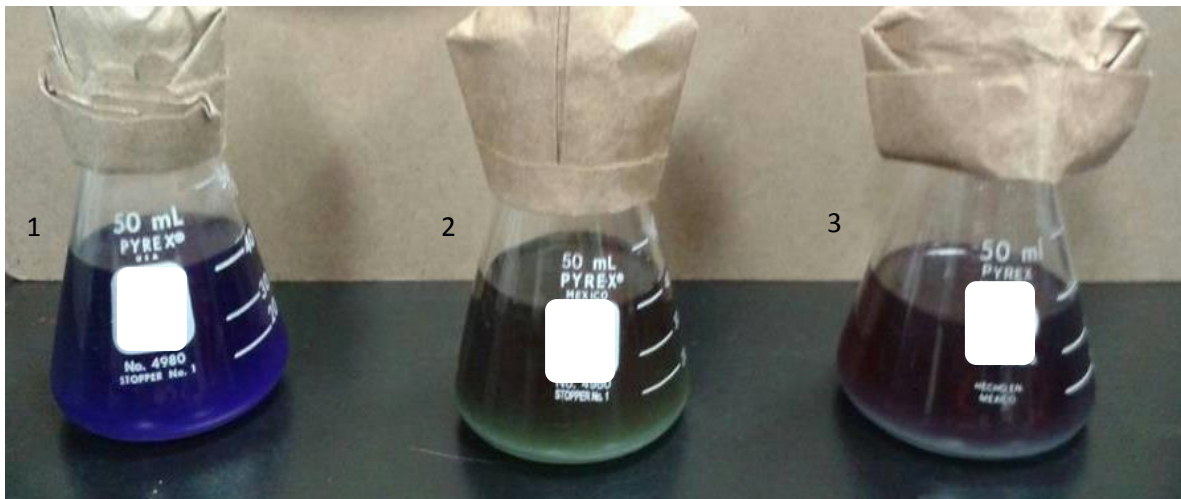


Figura 6. Medio de cultivo NBRIP-BPB líquido inoculado con BSF, **1** medio con fosfato de aluminio sin inoculo bacteriano, pH 7 (control -), **2** medio con fosfato de aluminio inoculado con BSF pH 3.4, **3** medio con fosfato de aluminio inoculado con BSF pH 3.69.

## 6.2 CAPACIDAD CUALITATIVA DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS

De las cepas evaluadas en el medio de cultivo NBRIP modificado con las fuentes de fosfato monocálcico, dicálcico, tricálcico, hidroxiapatita, roca fosfórica, fosfato de hierro y aluminio, solo 9 cepas (*Enterobacter* 1,2,3,4,5,6 y *Pantoea* 1,2,3) tuvieron la capacidad de crecer y en algunos casos formar una zona translúcida conocida como halo de solubilización (Figura 7), en el medio de cultivo asociado a fuentes de calcio (fosfato monocálcico, dicálcico, tricálcico e hidroxiapatita y roca fosfórica) para las cuales se muestran los índices de solubilización en la (Figura 8), sin embargo en los medios asociados a fuentes de fosfatos de hierro y aluminio de las 9 cepas la mayoría pudieron crecer en dichos medios aunque el tamaño de la colonia era muy pequeño y no se observaron halos de solubilización (Figura 9).

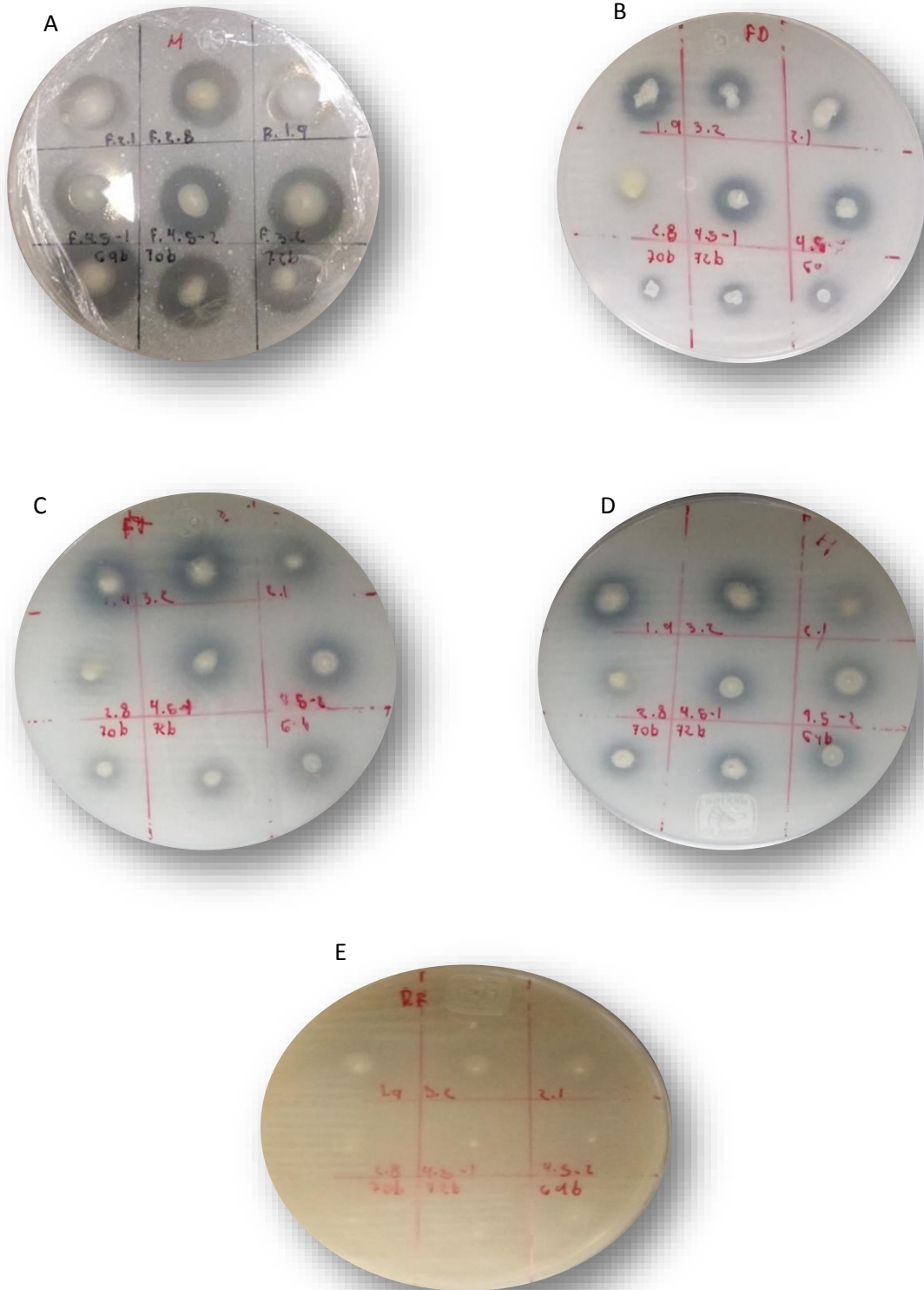


Figura 7. Halos de solubilización para las BSF (*Enterobacter* 1,2,3,4,5,6 y *Pantoea* 1,2,3) en el medio NBRIP modificado con diferentes fuentes de fosfato inorgánico, **panel A** fosfato monocálcico, **panel B** fosfato dicálcico, **panel C** fosfato tricálcico, **panel D** hidroxiapatita, **panel E** roca fosfórica.

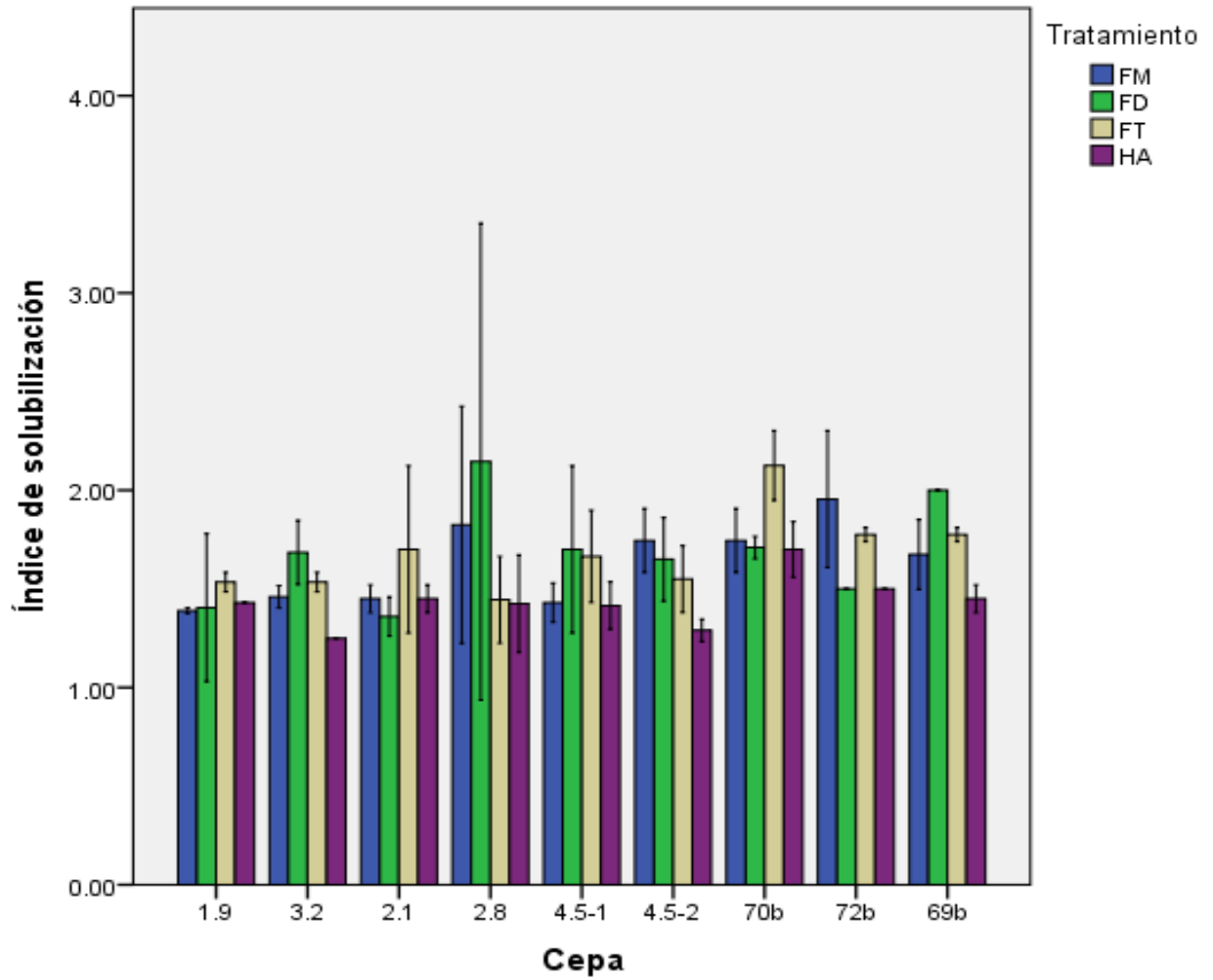


Figura 8 . Índices de solubilización para las 9 BSF seleccionadas (n= 3; barras de error muestran la desviación estándar), FM: fosfato monocálcico, FD: fosfato dicálcico, FT: fosfato tricálcico, HA: hidroxiapatita.

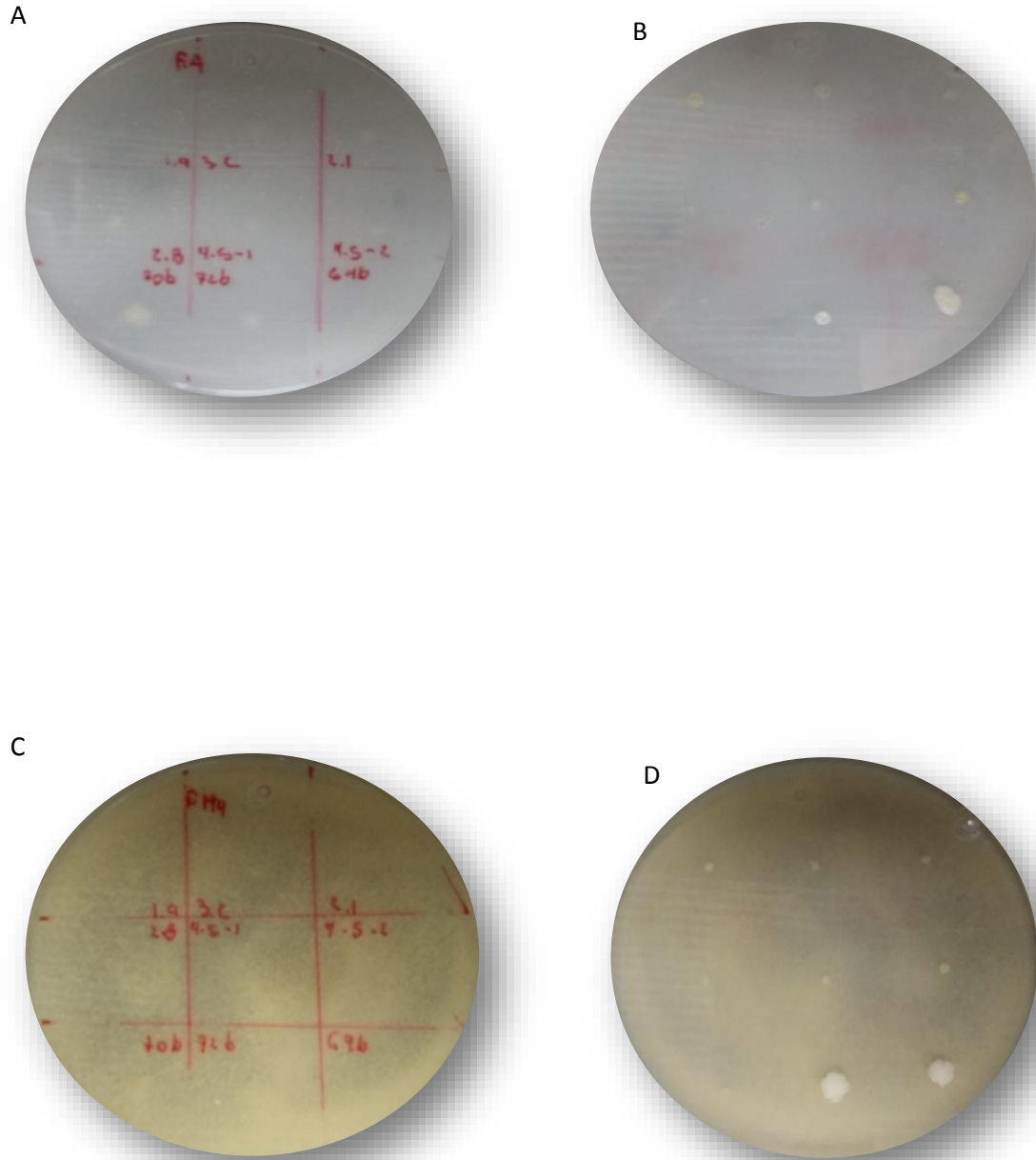


Figura 9. Halos de solubilización para las BSF (*Enterobacter* 1,2,3,4,5,6 y *Pantoea* 1,2,3) en el medio NBRIP modificado con diferentes fuentes de fosfato inorgánico, **panel A** fosfato de aluminio vista posterior de la caja Petri, **panel B** fosfato de aluminio vista anterior de la caja Petri, **panel C** fosfato de hierro vista posterior, **panel D** fosfato de hierro vista anterior.

Las 9 cepas seleccionadas formaron halos de solubilización con un IS entre  $> 1.25$  y  $2.14 (\pm 0.36)$  en los medios de cultivo con fuentes asociadas a calcio (fosfato monocálcico, dicálcico, tricálcico e hidroxiapatita), cabe mencionar que también se realizó el estudio con la fuente de fosfato roca fosfórica, sin embargo, solo se observó crecimiento de las cepas como se aprecia en la (Figura 7).

### 6.3 COMPORTAMIENTO DEL pH Y CAPACIDAD CUANTITATIVA DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS

El comportamiento del pH se midió durante 5 días para las 9 cepas seleccionadas, en los medios de cultivo NBRIP líquido modificados con la fuente de fosfato tricálcico, hidroxiapatita, fosfato de hierro y aluminio respectivamente, antes de iniciar con el experimento todos los medios de cultivo fueron ajustados a un pH de 7, para todos los medios de cultivo modificados con las diferentes fuentes de fosfato inorgánico se observó una disminución del pH en el transcurso de los días, los valores más bajos se observaron en los medios de cultivo que contenían fosfato de hierro y aluminio respectivamente (Figura 10).



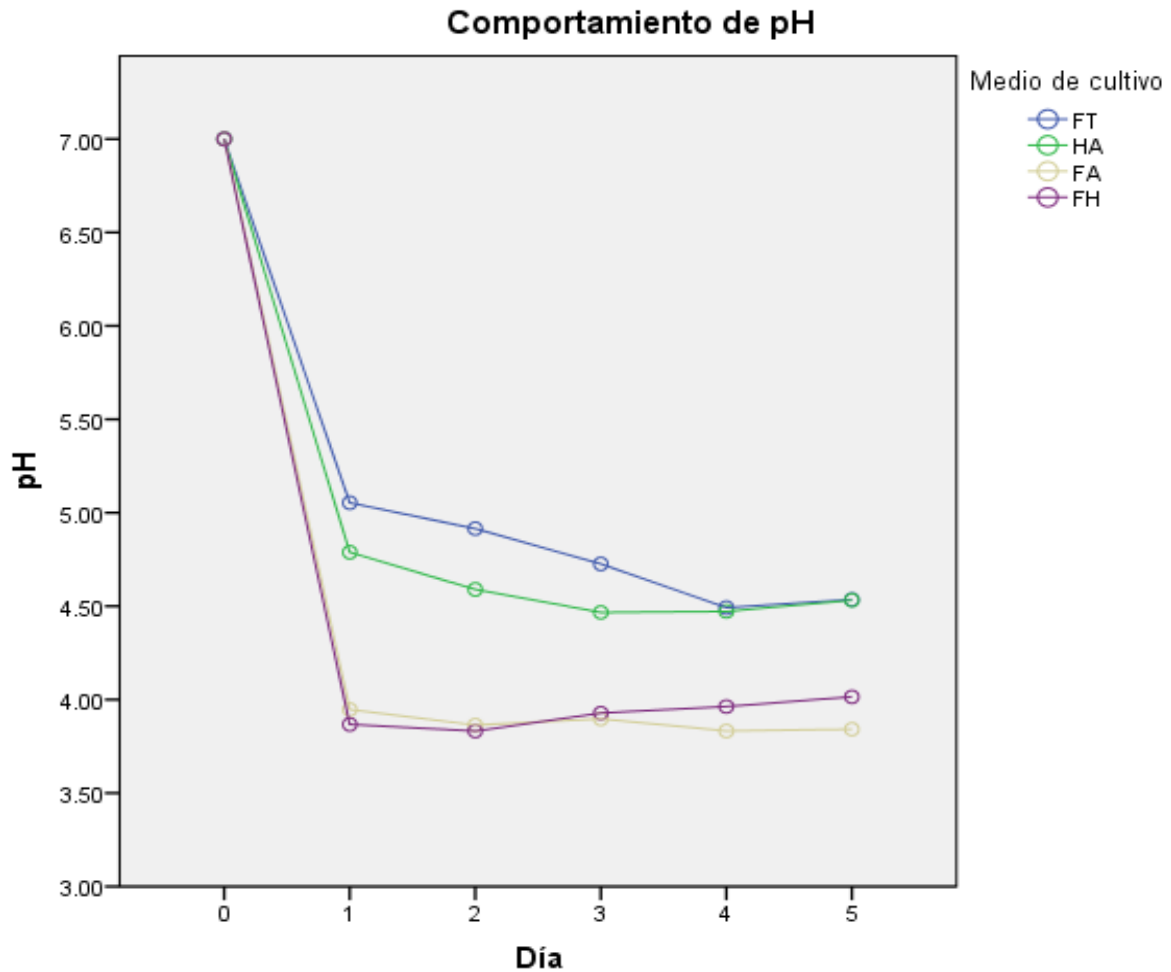


Figura 10. Comportamiento del pH en los diferentes medios de cultivo evaluados (FT =fosfato tricálcico, HA= hidroxapatita, FA= fosfato de aluminio, FH= fosfato de hierro) con las BSF inoculadas.

Dicha disminución de pH fue más marcada en los medios de cultivo inoculados con las diferentes BSF seleccionadas, a comparación del control negativo, donde se observó un valor constante de 7 para el medio con fosfato tricálcico y un valor promedio de 5.1 para el medio inoculado, para el caso del medio con hidroxapatita se observó una disminución promedio del pH de 7 a 6.2 en el grupo control y un valor promedio de 4.97 cuando se inoculó el medio. Los valores de pH más bajos fueron para los medios de cultivo que contenían fosfato de hierro y aluminio en donde el pH disminuyó de un valor de 7 a 4.85 y 4.66 en el grupo control respectivamente (Figura 11), esto probablemente a la naturaleza

ácida de dichas fuentes de fosfatos sin embargo para estos mismos medios cuando fueron inoculados con alguna de las BSF se observó la disminución de pH a valores por debajo de 4.5 en ambos casos (Figura 10).

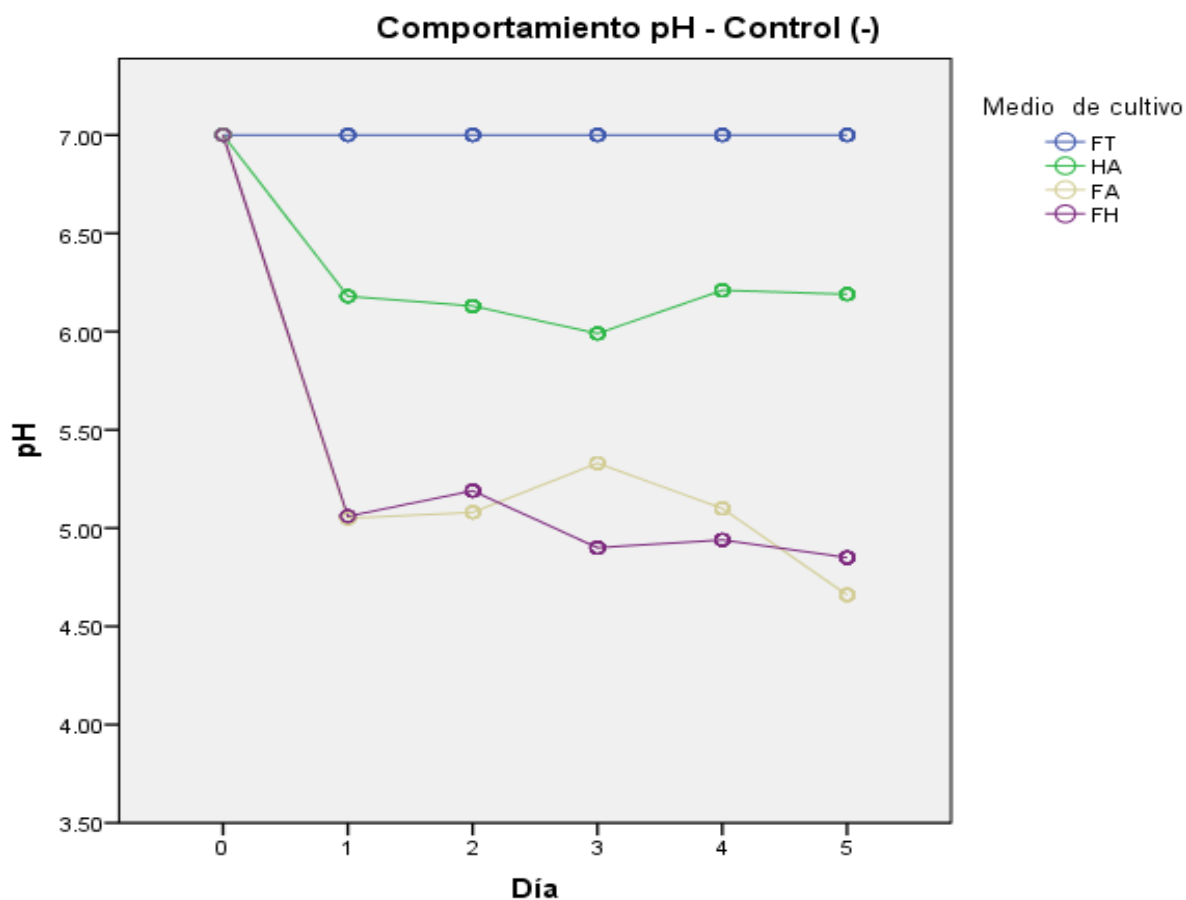


Figura 11. Comportamiento del pH para el grupo control (-) en los diferentes medios de cultivo evaluados (FT =fosfato tricálcico, HA= hidroxiapatita, FA= fosfato de aluminio, FH= fosfato de hierro) tiempo 0 después esterilizar el medio y ajustar pH a 7.

Como se mencionó en el apartado de materiales y métodos una parte de la muestra fue tratada para hacer los ensayos correspondientes a la capacidad cuantitativa de solubilización de fosfatos mediante un método colorimétrico (Chávez *et al* 2017), los resultados obtenidos muestran un aumento en la solubilización de fosfatos para las 9 BSF seleccionadas, las concentraciones más altas de fósforo soluble se observaron en los medios de cultivos líquidos con fuentes de fosfatos asociados a calcio ( fosfato tricálcico e

hidroxiapatita), en el caso del medio de cultivo con fosfato tricálcico se observó una concentración máxima de 2031 mg L<sup>-1</sup> y una concentración mínima de 292 mg L<sup>-1</sup> (Figura 12), el promedio de solubilización durante los 5 días para las 9 BSF evaluadas fue de 1088.66 mg L<sup>-1</sup>, y las concentraciones más altas durante los 5 días evaluados fueron para la cepa *Enterobacter* 3 con una solubilización promedio de 1548 mg L<sup>-1</sup>, el promedio de solubilización más bajo fue para la cepa *Enterobacter* 1 con 764 mg L<sup>-1</sup> (Figura13). En el caso del medio de cultivo con hidroxiapatita se observó un promedio de solubilización de 1071 mg L<sup>-1</sup> para las 9 BSF evaluadas, se registró una concentración máxima de 1699 mg L<sup>-1</sup> y una mínima de 601 mg L<sup>-1</sup> (Figura 12), las concentraciones más altas se registraron para la cepa *Enterobacter* 3 con un promedio de solubilización de 1510 mg L<sup>-1</sup>, el promedio de solubilización más bajo fue para la cepa *Enterobacter* 1 con 776 mg L<sup>-1</sup> (Figura 14).

Las concentraciones más bajas se observaron en los medios de cultivo que contenían fosfato de hierro y aluminio como fuentes de fosfato, para el caso del fosfato de aluminio se observó una concentración de solubilización promedio de 151 mg L<sup>-1</sup> para las 9 BSF, una concentración máxima de 355 mg L<sup>-1</sup> y una mínima de 0 mg L<sup>-1</sup>, la cepa que obtuvo las concentraciones más altas durante los 5 días fue *Pantoea* 1 con un promedio de solubilización de 192 mg L<sup>-1</sup>, el promedio de solubilización más bajo fue para la cepa *Enterobacter* 4 con 77 mg L<sup>-1</sup> (Figura 15). Para el medio de cultivo que contenía fosfato de hierro como fuente de fosfato se observó una concentración promedio de solubilización de 92.96 mg L<sup>-1</sup> para las 9 BSF, con una concentración máxima de 379 mg L<sup>-1</sup>, y una mínima de 3 mg L<sup>-1</sup> (Figura12), las concentraciones más altas se registraron para la cepa *Enterobacter* 5 con un promedio de solubilización de 146 mg L<sup>-1</sup>, la cepa con el promedio de solubilización más bajo fue *Pantoea* 2 con 31 mg L<sup>-1</sup> (Figura16).

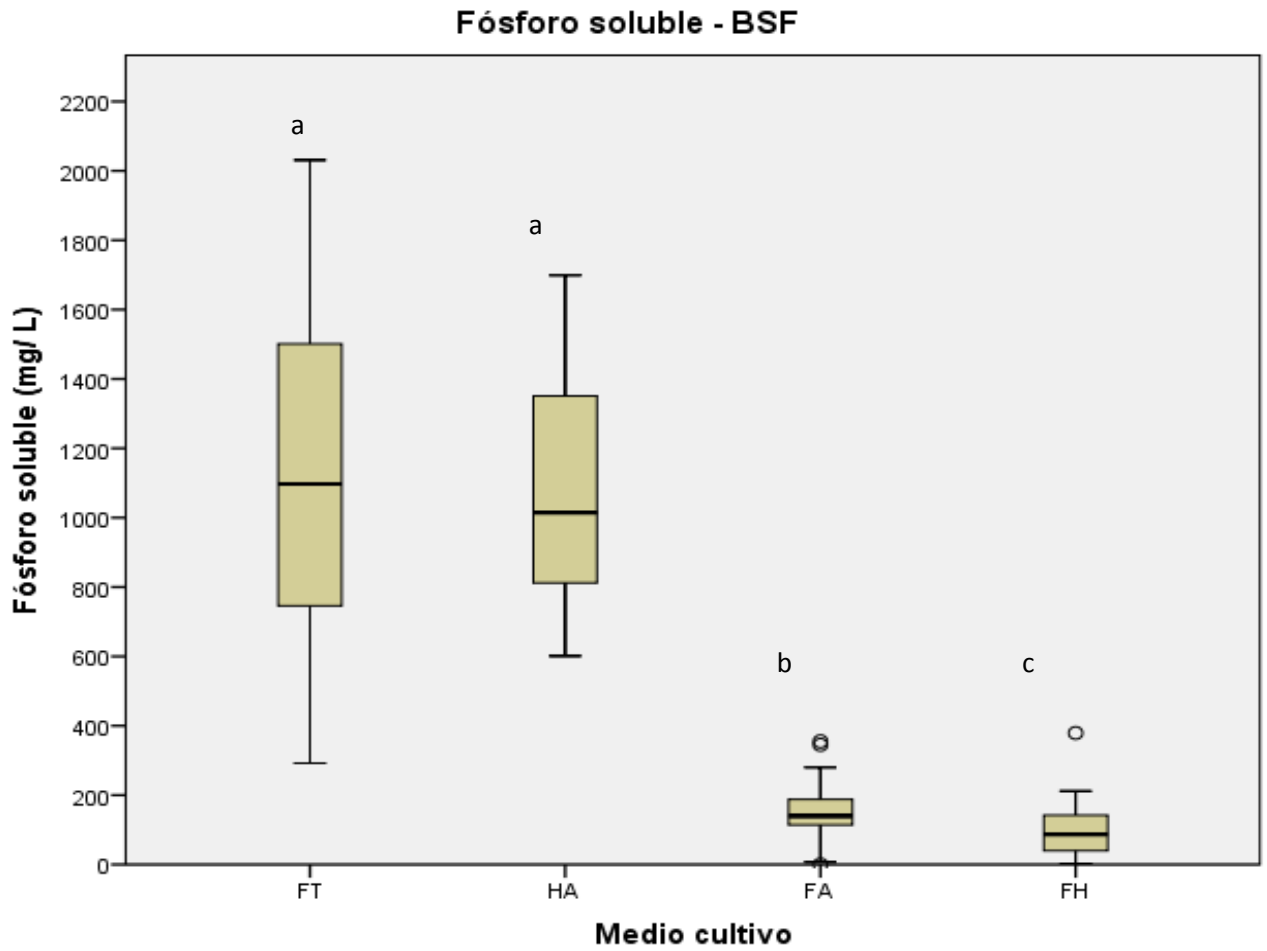


Figura 12. Concentración de fósforo solubilizado por las BSF en los medios de cultivo NBRIP con las diferentes fuentes de fosfato evaluadas (FT= fosfato tricálcico, HA= hidroxiapatita, FA= fosfato de aluminio, FH= fosfato de hierro), la barra horizontal en cada caja representa la mediana, las cajas representan el rango intercuartil y los bigotes representan los datos más extremos que están dentro de los cuartiles, los círculos representan los valores atípicos fuera de los cuartiles., letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

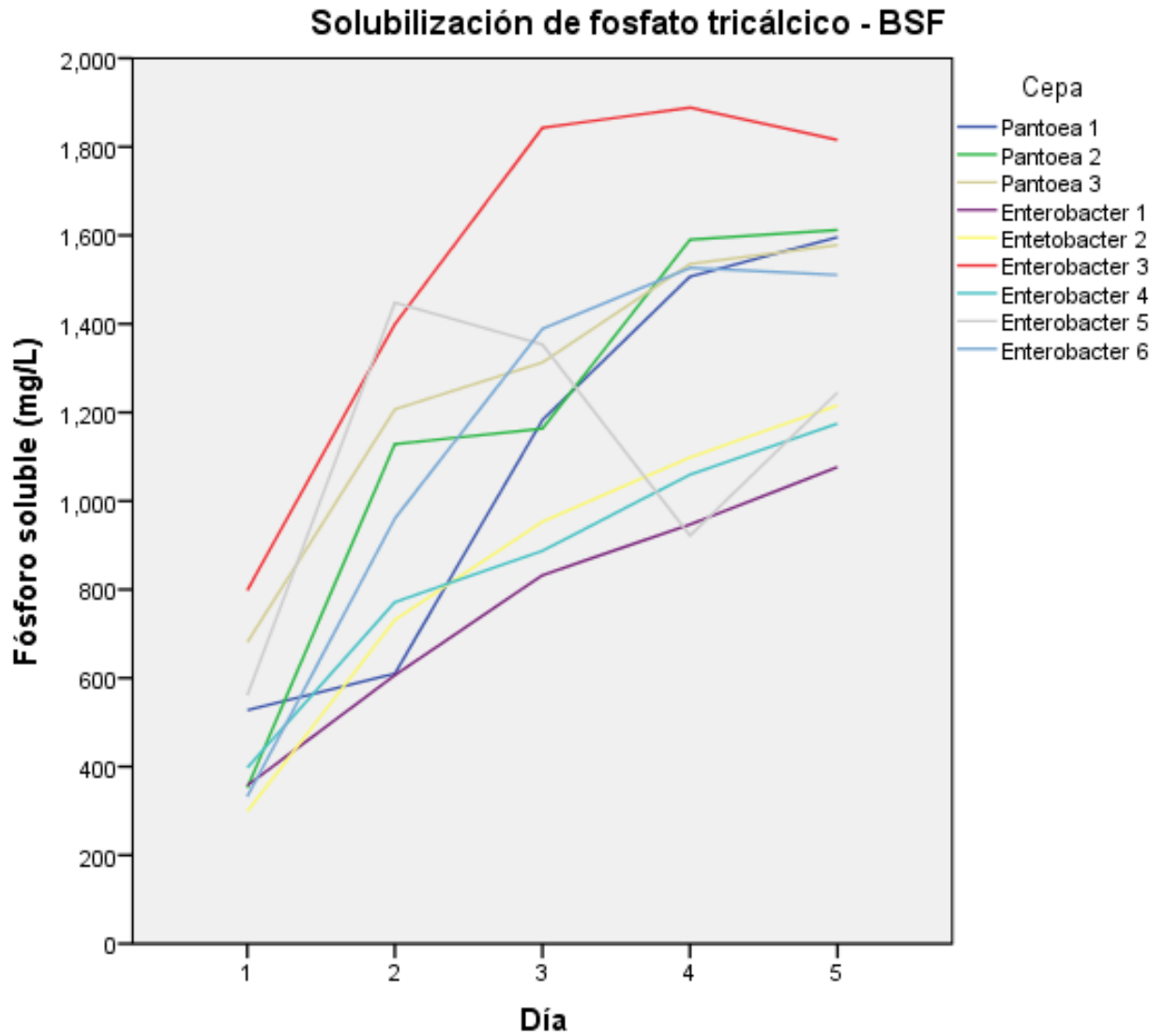


Figura 13. Cinética de la solubilización de fosfato tricálcico por parte de las BSF.

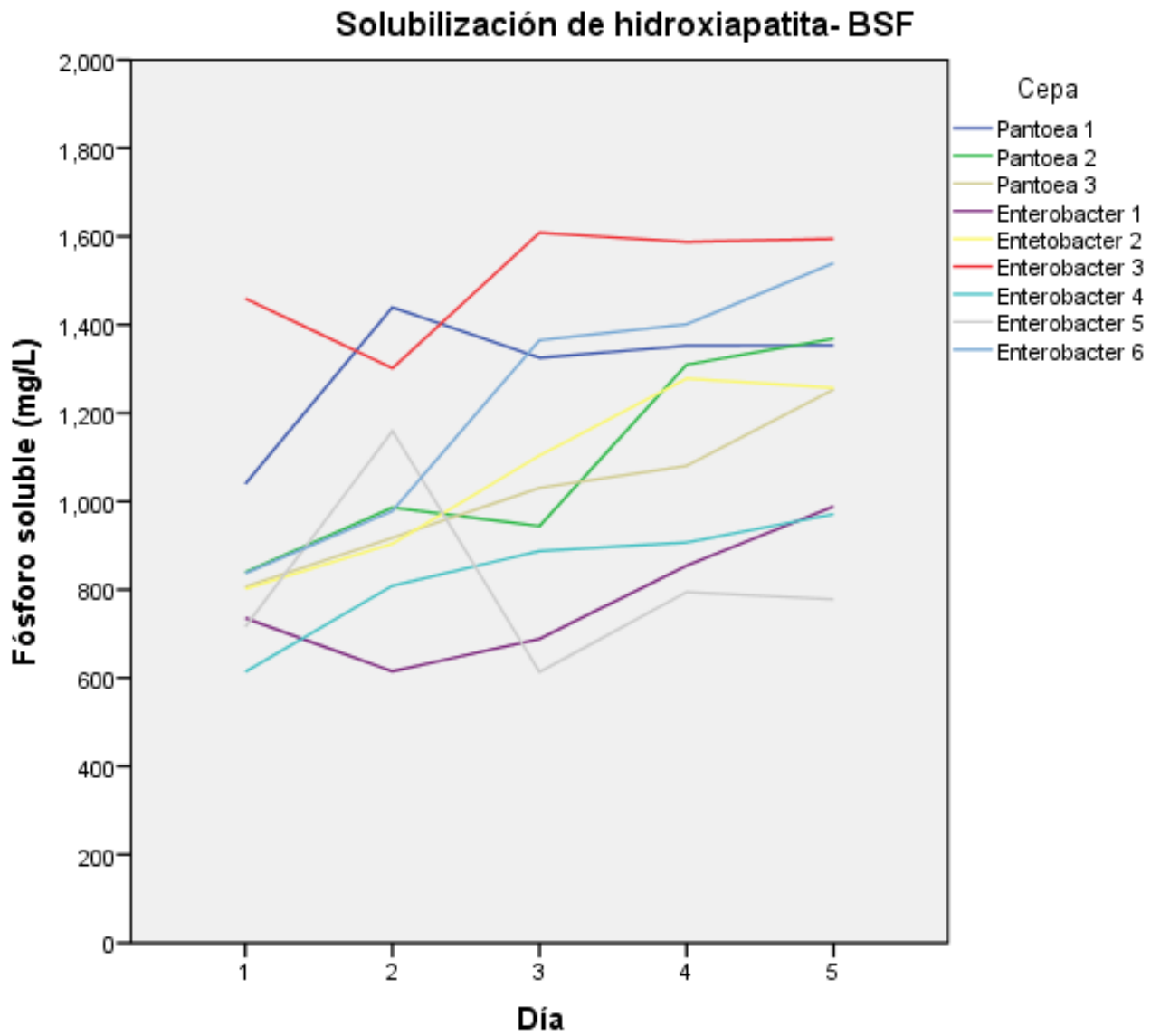


Figura 14. Cinética de la solubilización de hidroxiapatita por parte de las BSF.

### Solubilización fosfato de aluminio- BSF

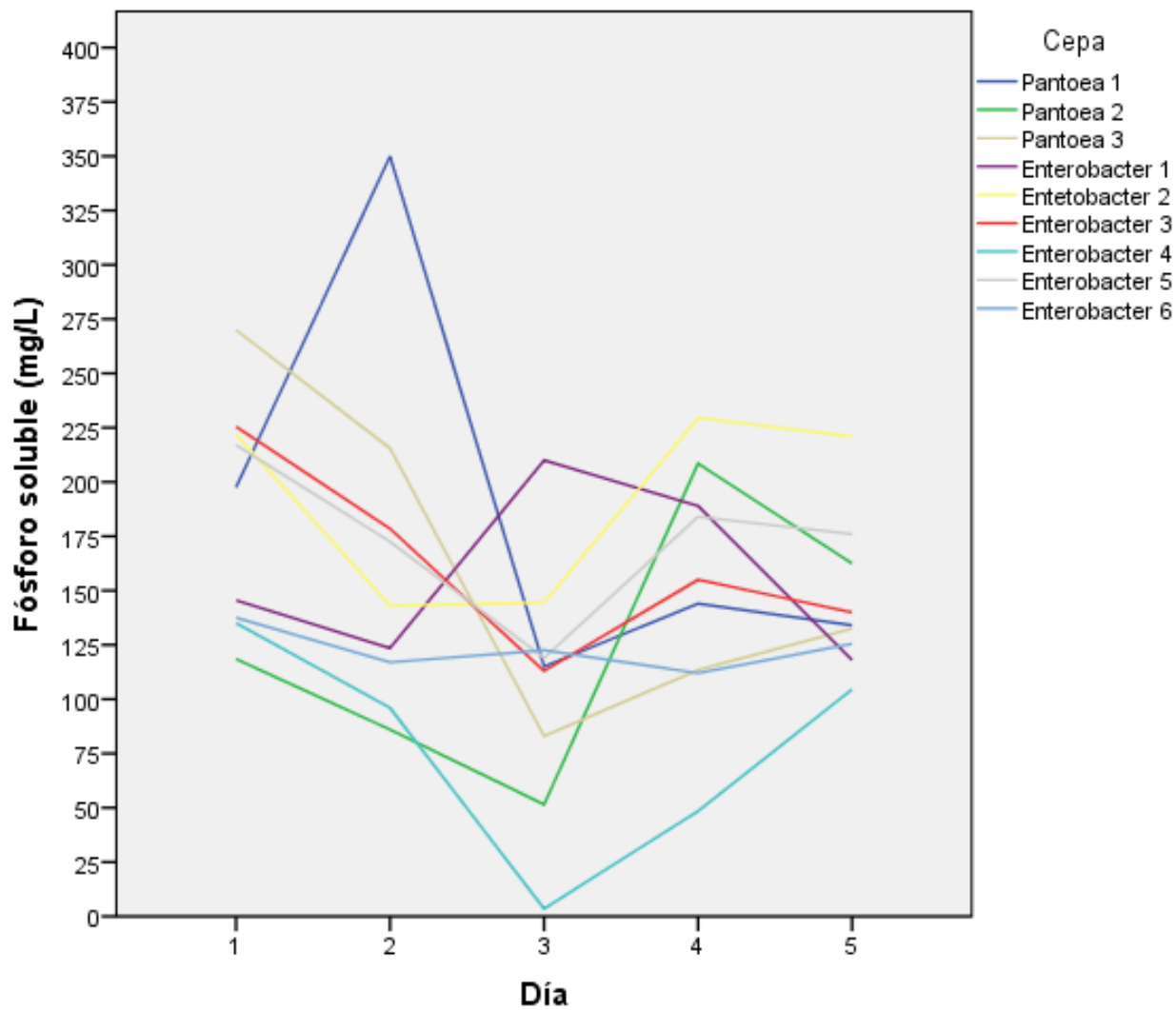


Figura 15. Cinética de la solubilización de fosfato de aluminio por parte de las BSF.

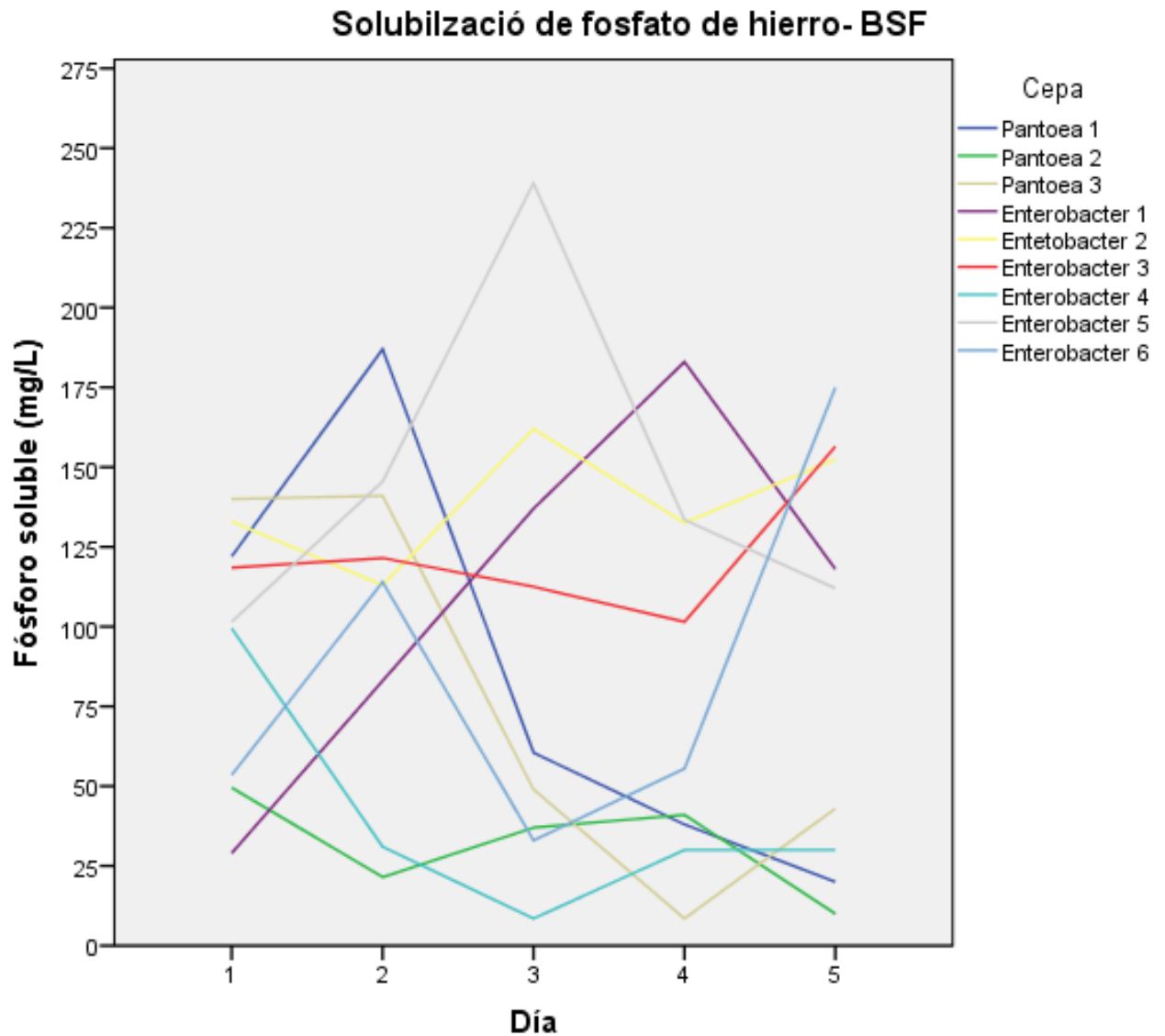


Figura 16. Cinética de la solubilización de fosfato de hierro por parte de las BSF.

Durante los ensayos se observó que el aumento en la solubilización de fósforo parece ser mayor conforme pasan los días para el caso del medio de cultivo con fosfato tricálcico e hidroxiapatita, en cambio para los medios de cultivo que contenían fosfato de hierro y aluminio parece mantenerse al paso de los días sin mucha variación en la solubilización (Figura 17).



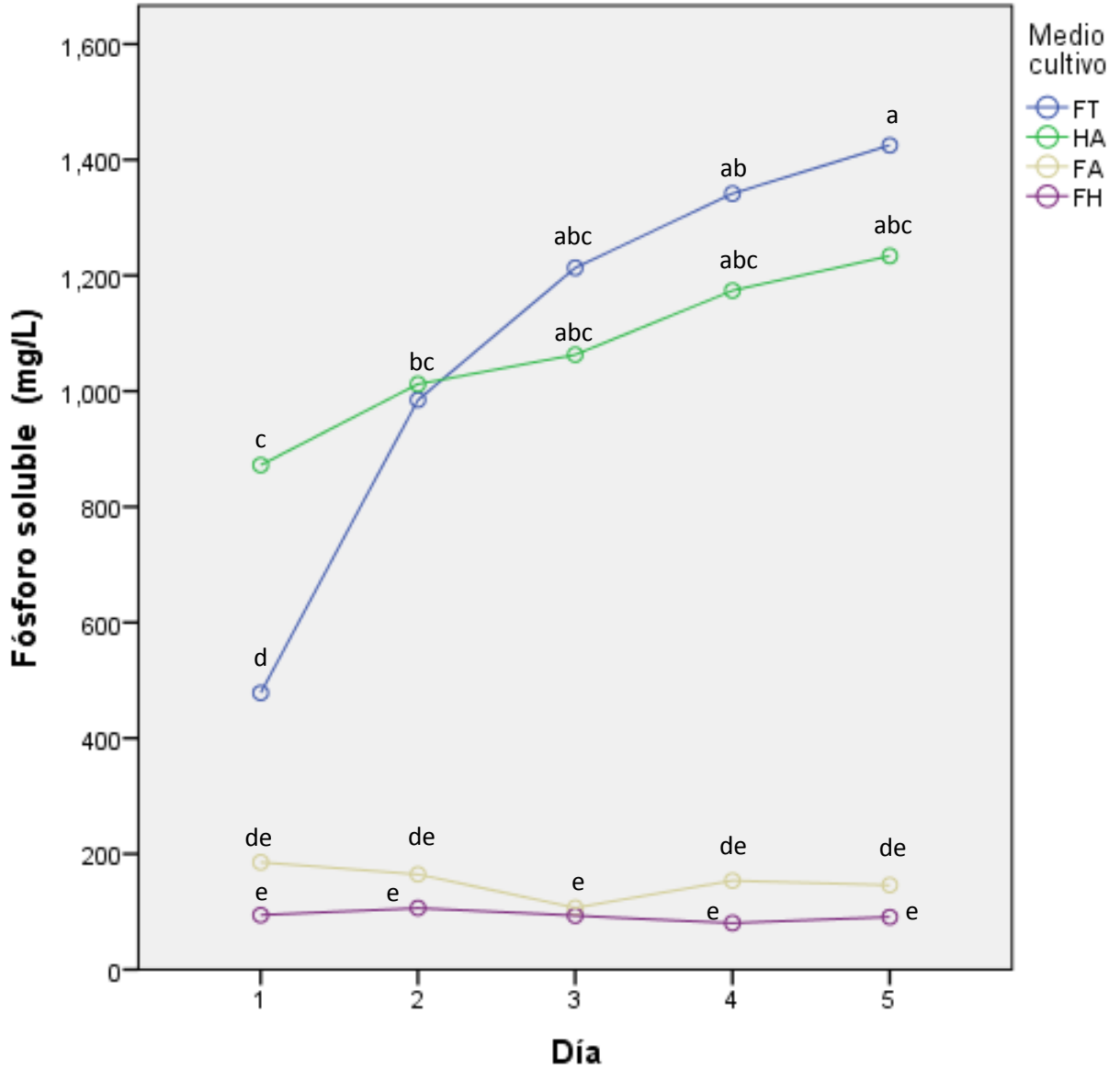


Figura 17. Comportamiento de solubilización de fosfatos para las BSF en el medio de cultivo NBRIP líquido con las diferentes fuentes de fosfatos evaluadas (FT= fosfato tricálcico, HA= hidroxapatita, FA= fosfato de aluminio, FH= fosfato de hierro), barras de error muestran la desviación estándar, letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

Al comparar la actividad de solubilización y el cambio en el pH en los medios de cultivo con las diferentes fuentes de fosfato inorgánico (fosfato tricálcico, hidroxapatita, fosfato de hierro y aluminio) se observó que para las fuentes de fosfato asociadas a calcio una disminución del pH a medida que aumentaba la concentración de fósforo solubilizado, a

comparación de las fuentes de hierro y aluminio donde no parece haber una relación en la disminución del pH y el aumento en la solubilización de fosfatos.

En todos los medios de cultivo con las distintas fuentes de Pi ( fosfato tricálcico, hidroxiapatita, hierro y aluminio) se observaron diferencias significativas a comparación del grupo control, el análisis con ANOVA mostró que el factor cepa y tratamiento producen diferencias significativas en el comportamiento del pH ( $p < 0.001$ ), teniendo un mayor efecto el factor cepa (R cuadrado = .951) que el tratamiento (R cuadrado= .937), cabe señalar que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con fosfato de hierro y aluminio ( $p = .536$ ) ya que los valores de pH oscilaron entre 4.8 y 4.6 respectivamente.

La variable de fósforo soluble se transformaron mediante la función  $1/(X+1)$  y se evaluó mediante un ANOVA, el análisis mostró que los factores día, cepa y tratamiento son significativos ( $p < 0.01$ ) teniendo una mayor efecto el tratamiento (R cuadrado = .970), esto corresponde a los resultados observados ya que las concentraciones más altas se observaron en los medios de cultivo con fuentes de calcio (fosfato tricálcico e hidroxiapatita) y las concentraciones más bajas fueron para los medios de cultivo con las fuentes de fosfatos de hierro y aluminio, cabe señalar que en todos los días del experimento se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

#### 6.4 IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS POR HPLC

La detección de ácidos orgánicos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), para las 9 BSF seleccionadas por medio de la comparación de los tiempos de retención con estándares comerciales (Figura 18), en algunos casos se observaron compuestos desconocidos, probablemente algunos ácidos orgánicos para los cuales no se contaba dentro de los estándares usados. Dentro de los ácidos orgánicos que se identificaron se encuentran: ácido oxálico, acético, glucónico, cítrico, málico, succínico, butírico, glicólico y láctico, aunque los más predominantes fueron el ácido oxálico, acético

y glucónico, seguidos del ácido cítrico y málico, los que tuvieron una mayor ausencia fueron el ácido láctico y glicólico (Tabla 1).

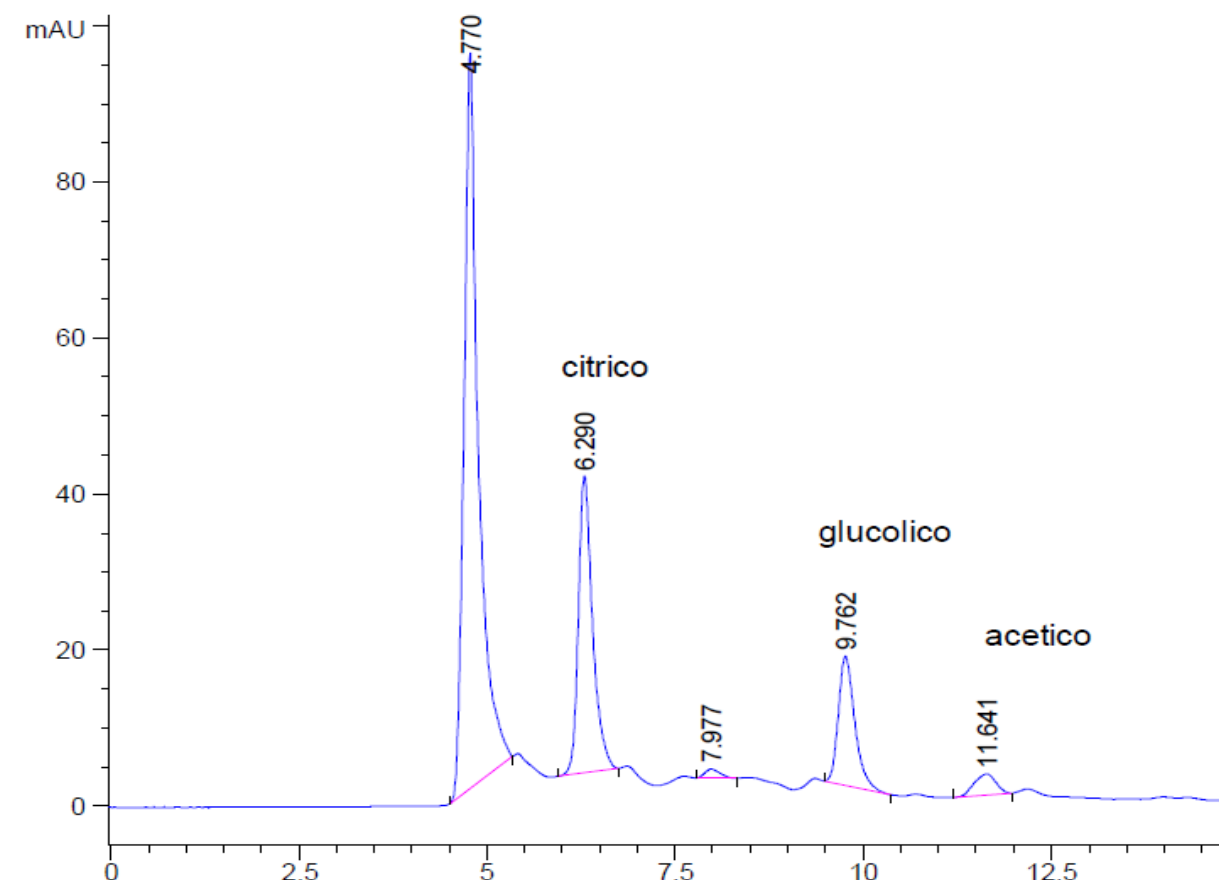


Figura 18. Perfil cromatográfico para tres estándares usados para la identificación de ácidos orgánicos, ácido oxálico (4.77 minutos), ácido cítrico (6.29 minutos), ácido glicólico (9.762 minutos), ácido acético (11.641 minutos).

Tabla 2. Ácidos orgánicos liberados por las 9 BSF, en ensayos con medio de cultivo NBRIP líquido.

<b>Cepa</b>	<b>Ácido orgánico producido en FT</b>	<b>Ácido orgánico producido en HA</b>	<b>Ácido orgánico producido en FH</b>	<b>Ácido orgánico producido en FA</b>
<i>Enterobacter 1</i>	O,A	O,C,A,B	O,A,C	O,C,A,G
<i>Enterobacter 2</i>	O,A,G,C	O,A,G,C	O,A,G,C,GL,M	O,A,G,C,M
<i>Enterobacter 3</i>	O,A,G,C	O,A,G,C	O,A,M	O,A,G,C,M
<i>Pantoea 1</i>	O,A,G,C,M,S	O,A,G,C,M,S	O,A,G,C,M	O,G,C,M
<i>Enterobacter 4</i>	O,A,G,GL,M,B	O,A,G,C,GL,M	O,A,C,M	O,A,C,M
<i>Enterobacter 5</i>	O,A,G,C,M	O,A,G,C,M	O,A,C,M	O,A,C,M
<i>Pantoea 2</i>	O,A,G,C,GL,S,B	O,A,G,B	O,A,C,M	O,A,C,M
<i>Pantoea 3</i>	O,A,G,C,GL,M,S	O,A,G,C,M,S	O,A,G,C,S	O,A,G,C,M,S
<i>Enterobacter 6</i>	O,A,G,C,M,B	O,A,G,C,M	O,G,C,M,B	O,A,G,C

Fuentes de fosfatos evaluadas (FT= fosfato tricálcico, HA= hidroxiapatita, FA= fosfato de aluminio, FH= fosfato de hierro), ácido acético (A), butírico (B), cítrico (C), glicólico (GL), glucónico (G), láctico (L), málico (M), oxálico (O), succínico (S).

Para los 9 ácidos orgánicos se realizó un ANOVA de Friedman mostrando diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre la presencia de los diferentes ácidos orgánicos, cabe señalar que en los medios de cultivo con las fuentes de fosfatos asociadas a calcio (fosfato tricálcico e hidroxiapatita) los ácidos orgánicos que se detectaron con mayor frecuencia fueron los ácidos: oxálico, glucónico y acético, mientras que en los medios de cultivo con las fuentes de fosfatos asociados a hierro y aluminio los ácidos orgánicos que se registraron con mayor

frecuencia fueron: acético, oxálico y málico, para los ácidos glucónico, málico, butírico, láctico, acético y glicólico no se encontraron diferencias significativas en la presencia de dichos ácidos para el factor día ( $p>0.05$ ), en todos los ácidos orgánicos se encontraron diferencias significativas para el factor cepa ( $p<0.05$ ) a excepción del ácido láctico ( $p>0.05$ ), y en el caso del factor tratamiento todos los ácidos orgánicos evaluados presentaron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) a excepción del ácido cítrico ( $p>0.05$ ), los resultados de la prueba de V de Cramer con respecto a la ausencia o presencia de ácidos orgánicos para las distintas BSF empleadas mostraron una asociación de los diferentes ácidos orgánicos y las variables día, cepa y tratamiento, obteniendo los coeficientes más altos para la variable día (datos no mostrados).

## 6.5 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR

La identificación bioquímica se llevó a cabo por medio del sistema Biolog® el cual es un sistema comercial que permite diferenciar microorganismos entre ellos bacterias en base a la oxidación de 95 fuentes de carbono, en el caso de la identificación molecular se llevó a cabo mediante el análisis en BLASTN y en SILVA: base de datos de ARN ribosomal de alta calidad, de las secuencias obtenidas de la amplificación del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S, los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 3. Identificación bioquímica y molecular de las 9 BSF evaluadas.

<b>Cepa</b>	<b>Número de acceso GenBank</b>	<b>% Identidad en BLAST</b>	<b>Descripción</b>	<b>% Identidad en SILVA</b>	<b>Descripción</b>	<b>Biolog®</b>
<i>Enterobacter 1</i>	HQ242725.1	99	<i>Enterobacter</i>	99	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Enterobacter 2</i>	HQ242725.1	99	<i>Enterobacter</i>	98	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Enterobacter 3</i>	HQ242724.1	99	<i>Enterobacter</i>	98.7	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Pantoea 1</i>	KC139414.1	93	<i>Pantoea</i>	97.81	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i>
<i>Enterobacter 4</i>	JQ398852.1	78	<i>Enterobacter</i>	75.37	Sin clasificar	<i>Enterobacter</i>
<i>Enterobacter 5</i>	JX1745253.1	99	<i>Leclercia</i>	98.93	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Pantoea 2</i>	KJ184988.1	99	<i>Pantoea</i>	99.54	<i>Pantoea sp.</i>	<i>Pantoea</i>
<i>Pantoea 3</i>	-	-	-	-	-	<i>Pantoea</i>
<i>Enterobacter 6</i>	-	-	-	-	-	<i>Enterobacter</i>

De las 9 BSF identificadas 6 cepas pertenecen al género *Enterobacter* y 3 cepas al género *Pantoea*, ambos géneros han sido ampliamente reportados como solubilizadores de fosfatos.

## 7. DISCUSIÓN

Como se ha mencionado anteriormente el fósforo es uno de los elementos más importantes para el correcto desarrollo de las plantas, sin embargo, debido a la elevada retención por la matriz del suelo, su relativa escases edáfica, la falta de fuentes naturales y su progresiva pérdida por procesos de escorrentía y lixiviación, es necesario en la mayoría de los casos suministrar este nutriente a través de fertilizantes químicos los cuales en el mejor de los casos solo un 20 – 30% del Pi contenido en ellos será realmente utilizado por las plantas, el resto del P contenido en ellos quedará fijado en la matriz del suelo a otros elementos como puede ser calcio, hierro, aluminio, magnesio y manganeso, es por ello que en los últimos años se ha hecho especial hincapié en buscar otras opciones más amigables con el ambiente y fomentar una agricultura más sustentable, una de ellas es el estudio y uso de las BSF las cuales tienen la capacidad de solubilizar el Pi unido a otros compuestos en una forma inorgánica soluble la cual puede ser aprovechada por la plantas.

Para ello se han desarrollado diversos métodos para la selección de BSF, siendo los más comunes, medios de cultivo para identificar de una forma visual la capacidad cualitativa de solubilización, entre los medios más utilizados se encuentran: medio PVK (Pikovskaya, 1948), Sperber (Sperber, 1958) y NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) (Nautiyal, 1999), sin embargo se ha mencionado que el medio NBRIP resulta ser un excelente medio mínimo para la identificación de las BSF más eficientes, algunos autores han mencionado que la solubilización de fosfatos puede aumentar con la ausencia de extracto de levadura como es el caso del medio SMR-1, aunque no se observa este efecto en el medio NBRIP <sup>57</sup>, sin embargo otros autores mencionan que al adicionar extracto de levadura se obtiene una mayor solubilización, ya que este proporciona factores que promueven el crecimiento así como la producción de metabolitos bacterianos <sup>22</sup>, sin embargo para el presente estudio se decidió usar el medio de cultivo NBRIP.

De las 230 cepas evaluadas se identificaron 9 cepas con la capacidad cualitativa para la solubilización de fosfatos, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el medio de cultivo NBRIP modificado, es una buena opción para la selección de BSF de

múltiples fuentes de Pi principalmente asociadas a calcio (roca fosfórica, hidroxiapatita, fosfato monocálcico, fosfato dicálcico y fosfato tricálcico), se observó que el promedio del IS para el fosfato tricálcico fue de 1.68, los IS más altos se observaron en las cepas *Pantoea* 2 y 3 con un IS de 2.13 y 1.78, respecto a las cepas pertenecientes al género *Enterobacter* el IS más alto registrado fue para la cepa *Enterobacter* 6 y 3 con un IS de 1.78 y 1.70 respectivamente, dichos resultados se encuentran dentro de los valores reportados en la bibliografía<sup>17,23,58</sup>, algunos autores han caracterizado la capacidad de solubilización en base al IS en tres niveles: bajo ( $IS < 2$ ), intermedio ( $IS$  entre 2 y 4, o alto ( $IS > 4$ )<sup>58</sup>, sin embargo el uso de este ensayo cualitativo no resulta del todo adecuado ya que varios factores podrían influir en el resultado como es la concentración del inóculo, preparación del medio de cultivo, y como se ha observado en el presente trabajo dicho índice aplica solamente para resultados obtenidos en el medio de cultivo con fosfato tricálcico como única fuente de fosfato.

En los medios de cultivo con las fuentes de fosfatos asociados a hierro y aluminio, el crecimiento fue mínimo además de que no se observó halo de solubilización, cabe señalar que en la mayoría de los estudios reportados en la bibliografía la fuente de fosfato principal es el fosfato tricálcico, aunque también se han estudiado otras fuentes de fosfatos como es la hidroxiapatita y roca fosfórica<sup>6,14,52,59</sup>, sin embargo son pocos los estudios que se han realizado con fuentes de fosfatos asociadas a hierro y aluminio<sup>60-62</sup>, esto puede deberse a la estabilidad del complejo y la toxicidad que puede provocar en los microorganismos<sup>63</sup>

También se han reportado casos contradictorios en donde cepas que no son capaces de formar halos de solubilización en medios sólidos, pueden solubilizar fosfatos en medios líquidos, debido al grado de difusión de los ácidos orgánicos secretados por las BSF<sup>51,53</sup>, es por ello que se decidió seguir trabajando con las 9 BSF seleccionadas y determinar la capacidad cuantitativa para la solubilización de fosfatos en medios de cultivo líquido.

Como se explicó en el apartado de materiales y métodos una parte de la muestra se usó para determinar el comportamiento del pH en los medios de cultivo con las diferentes fuentes de fosfato usadas al ser inoculadas con cada una de las 9 BSF seleccionadas, en



todos los ensayos realizados se observó una disminución del pH, y diferencias significativas respecto al grupo control, esta disminución en el pH del medio se ha atribuido a la liberación de ácidos orgánicos, el cual se ha propuesto como el principal mecanismo microbiológico para la solubilización de fosfatos por parte de las BSF, los valores más bajos registrados fueron para la cepa *Pantoea* 3 con 4.05 en el medio de cultivo con fosfato tricálcico, en el caso del medio de cultivo con hidroxiapatita fue de 3.33 para la cepa *Enterobacter* 6, para los medios de cultivo que contenían fosfato de hierro y aluminio como fuente de fosfato, al ser inoculado con las BSF seleccionadas se observó una disminución aun mayor a valores por debajo de 4.5 lo que indica que la presencia del inoculo bacteriano tiene un efecto en el medio de cultivo logrando disminuir aún más el valor del pH, el valor más bajo que se registró fue de 3.39 y 3.53 para la cepa *Enterobacter* 4 en el medio de cultivo con fosfato de hierro y aluminio respectivamente.

El resto de la muestra se usó para evaluar cuantitativamente la capacidad solubilizadora de las 9 BSF seleccionadas, los resultados obtenidos muestran un aumento gradual en la solubilización de fosfatos en el transcurso de los 5 días que duro el experimento para los medios de cultivo con las fuentes de fosfatos tricálcico e hidroxiapatita, a comparación de los medios con las fuentes de fosfatos de hierro y aluminio donde no parece haber un aumento gradual conforme el transcurso de los días, cabe señalar que las cepas que registraron las concentraciones más altas durante los 5 días del experimento para los medios con fosfato tricálcico, fueron la cepas *Enterobacter* 3 y *Pantoea* 3 con concentraciones de 1548 mg L<sup>-1</sup> y 1262 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, estos resultados se encuentran por encima de algunos reportados en la bibliografía con concentraciones que van desde los 1128 mg L<sup>-1</sup>, 841 mg L<sup>-1</sup> y 717 mg L<sup>-1</sup> <sup>13,48,62</sup>,

En el caso de los medios con hidroxiapatita como fuente de fosfato las cepas que registraron las mayores concentraciones fueron las cepas *Enterobacter* 3 y *Enterobacter* 6 con 1699 mg L<sup>-1</sup> y 1544 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, dichos resultados se encuentran por encima de algunos resultados reportados por otros autores 351 µg L<sup>-1</sup> y 230 µg L<sup>-1</sup> <sup>22,64</sup>, los resultados obtenidos en el presente trabajo resultan importantes ya que la mayor parte del Pi presente en los suelos se encuentra en rocas y minerales primarios como son las

oxiapatitas, apatitas e hidroxiapatitas, las cuales se caracterizan por ser formas bastante insolubles, ya que dentro de los compuestos de calcio la fluorapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  e hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  son los compuestos más estables y menos solubles con una solubilidad de  $\sim 0.2 \text{ mgL}^{-1}$  y  $\sim 0.3 \text{ mgL}^{-1}$  respectivamente <sup>51</sup>. Además que a nivel de laboratorio la hidroxiapatita junto con el fosfato tricálcico son las fuentes más usadas en los medios de cultivo para la identificación visual de la capacidad cualitativa para la solubilización de fosfatos por los microorganismos <sup>13,19,46</sup>.

En el caso de los medios de cultivo con las fuentes de fosfatos de hierro y aluminio se observaron concentraciones menores a las observadas en las fuentes de calcio, con concentraciones máximas durante los 5 días para las cepas *Enterobacter* 5 y *Enterobacter* 1 con  $379 \text{ mg L}^{-1}$  y  $212 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente para el medio con fosfato de hierro y las cepas *Pantoea* 1 y *Pantoea* 3 con  $355 \text{ mg L}^{-1}$  y  $280 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente para el medio con la fuente de fosfato de aluminio, valores que en algunos casos son mayores a los reportados  $14 \text{ mg L}^{-1}$  y en otros casos menores  $442.8 \text{ mg L}^{-1}$  y  $247.5 \text{ mg L}^{-1}$  a los reportados en la bibliografía <sup>13</sup>, se ha mencionado que la solubilización del fosfato de hierro y aluminio se puede dar de una forma más lenta debido a la estabilidad del complejo, esto puede observarse en los resultados obtenidos ya que las concentraciones varían muy poco para los medios de cultivo con las fuente de fosfatos de hierro y aluminio en el transcurso de los días.

Como se ha mencionado anteriormente son pocos los estudios en donde se han empleado como fuente de fosfatos en los medios de cultivo fosfato de hierro y aluminio, sin embargo en suelos agrícolas ácidos las formas predominantes son los fosfatos asociados a hierro o aluminio como la livianita y estrengita en el caso de los fosfatos de hierro y variscita para los fosfatos de aluminio las cuales son muy poco solubles y pueden liberar fósforo muy lentamente por el proceso de meteorización, en el presente estudio se muestra que las 9 BSF seleccionadas tienen la capacidad de solubilizar fuentes de fosfatos asociadas a hierro y aluminio, en menor cantidad que los fosfatos de calcio, esto puede deberse al entorno ácido del medio y de la toxicidad de dichos compuestos para los microorganismos.

Son diversos los mecanismos que se han reportado por los cuales las BSF pueden llevar a cabo la solubilización de fosfatos dentro de los que se encuentran: quelación, reacciones de intercambio, procesos de acidificación, acción enzimática, sin embargo el principal mecanismo microbiológico que se ha propuesto para la solubilización de fosfatos es la producción y liberación de ácidos orgánicos con la consecuente disminución del pH extracelular y acidificación del medio, los ácidos orgánicos son compuestos de bajo peso molecular que vienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular como péptidos, lípidos y carbohidratos <sup>54</sup>, los ácidos orgánicos poseen uno o más grupos carboxilo e hidroxilo, además de poseer una carga negativa, dichas propiedades permiten disminuir el pH del medio hasta valores óptimos para que se lleve a cabo el proceso de solubilización.

Dichos compuestos pueden formar complejos solubles con iones como el  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ , y  $\text{Al}^{+3}$ , son diversos los ácidos orgánicos producidos por los MSF, sin embargo, los principales ácidos orgánicos que se han reportado son los ácidos 2-cetogluconico, glucónico, oxálico y acético, en el caso particular del ácido glucónico, puede sufrir otras dos oxidaciones y pasar a ácido 2-cetoglucónico o 2,5-dicetoglucónico. Dentro de los ácidos orgánicos que se han reportado para el género *Enterobacter* se encuentran: ácido glucónico, 2-cetoglucónico, láctico, isovalérico, isobutírico, acético y oxálico <sup>46</sup>, en el caso del genero *Pantoea* los principales ácidos orgánicos que se han reportado son: ácido glucónico, 2-cetoglucónico, málico, succínico, láctico, fumárico, fórmico, propiónico, adípico y butírico <sup>22</sup>,

En los resultados obtenidos en el presente trabajo se observó que los ácidos orgánicos con mayor presencia en las BSF seleccionadas fueron los ácidos: glucónico, acético y oxálico para todas las fuentes de fosfato empleadas (fosfato tricálcico, hidroxiapatita, fosfato de hierro y aluminio), sin embargo, se observó que en las fuentes de fosfato asociadas a calcio los ácidos orgánicos con mayor presencia eran los ácidos: acético, glucónico y oxálico, en cambio en las fuentes de fosfatos de hierro y aluminio se observó mayor presencia de los ácidos acético, málico y oxálico. Cabe señalar que para la cepa *Enterobacter* 3 que presentó las concentraciones más altas de fósforo soluble para fosfato tricálcico e hidroxiapatita, los principales ácidos orgánicos para dicha cepa fueron el ácido acético, oxálico y glucónico, en el caso de la cepa *Pantoea* 1 que obtuvo las concentraciones más altas de fósforo soluble

para fosfato de aluminio el ácido málico fue el que se registró con mayor frecuencia, y por ultimo para la fuente de fosfato de hierro la cepa *Enterobacter* 5 fue la que presentó las concentraciones más altas de fósforo soluble siendo el ácido málico uno de los principales ácidos orgánicos registrados. Los ácidos orgánicos con menor presencia fueron los ácidos glicólico y butírico.

En varios estudios se ha reportado que la liberación de ácidos por parte de las BSF, varían dependiendo de la fuentes de P utilizada en el medio y también podrían variar de acuerdo a la fuente de carbono usada <sup>22</sup>, ya que las rutas biosintéticas de dichos compuestos son diversas. Dentro de éstas se encuentra la oxidación directa de la glucosa (ácido glucónico, 2-cetoglucónico y 2,5-dicetoglucónico), ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ácido oxálico, cítrico, málico, fumárico), fermentación acética (ácido acético), láctica (ácido láctico), oxidación anaerobia del piruvato (ácido butírico), y en algunos casos particulares de cepas *Bacillus liqueniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* que pueden producir mezclas de ácidos orgánicos como ácido isovalérico e isobutírico <sup>19,46,47</sup>, cabe señalar que son pocos los estudios realizados en torno a la solubilización de fuentes de fosfatos de hierro y aluminio, los ácidos orgánicos que se han registrado para estas fuentes de fosfato son el ácido acético, oxálico, glucónico, succínico, málico y cítrico <sup>63,65</sup>. Además se ha mencionado que para estas fuentes de fosfatos el potencial de desorción de los ácidos orgánicos está ligado a la constante de la estabilidad del complejo ( $\log K_{Al}$  or  $\log K_{Fe}$ ) en el siguiente orden: ácido cítrico > oxálico > málico > tártrico > láctico > glucónico > acético<sup>57</sup>, en los resultados obtenidos en el presente estudio observamos que los ácidos orgánicos de mayor presencia en los medios de cultivo con fuentes de fosfato tricálcico e hidroxiapatita fueron los ácidos acético, glucónico y oxálico, sin embargo cuando se realizó la identificación de ácidos orgánicos en medios de cultivo con fuentes de fosfatos de hierro y aluminio se observó un cambio del ácido glucónico por ácido málico, esto fue para BSF tanto del género *Enterobacter* como *Pantoea*, lo que sugiere que las rutas biosintéticas implicadas en la solubilización de fosfatos varían dependiendo de la fuente de fosfato, y abre el estudio a posteriores investigaciones en torno al papel que desempeñan los ácidos orgánicos en la solubilización de fosfatos ya que hasta la fecha estos procesos siguen siendo desconocidos.

## 8. CONCLUSIONES

- Las 9 BSF seleccionadas tuvieron la capacidad de solubilizar diferentes fuentes de Pi (fosfato tricálcico, hidroxapatita, fosfato de hierro y aluminio) en condiciones *in vitro*.
- Las cepas bacterianas son capaces de solubilizar de manera diferencial las diferentes fuentes de fosfatos.
- La cepa *Enterobacter* 3 fue la más eficiente para la solubilización de fosfato tricálcico e hidroxapatita.
- La cepa *Pantoea* 1 fue la más eficiente en la solubilización de fosfato de aluminio.
- La cepa *Enterobacter* 5 fue la más eficiente en la solubilización de fosfato de hierro.
- La solubilización de fosfatos por parte de las BSF evaluadas fue mayor para fuentes de fosfatos asociadas a calcio a comparación de las fuentes de fosfatos asociadas a hierro y aluminio.
- Los ácidos orgánicos: acético, glucónico y oxálico se asocian más con la solubilización de fosfatos de calcio (fosfato tricálcico e hidroxapatita), mientras que los ácidos acético, málico y oxálico se asocian más a la solubilización de fosfatos de hierro y aluminio.

## 9. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos para observar el consumo de sustratos por parte de las BSF en medios de cultivo con diferentes fuentes de Pi.
- Búsqueda de otros mecanismos promotores del crecimiento vegetal en las BSF seleccionadas.
- Cuantificar la producción de ácidos orgánicos por parte de las BSF.
- Realizar ensayos en invernadero con las BSF seleccionadas para comprobar su capacidad solubilizadora en algún cultivo de interés agronómico.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander Pérez-Cordero , Adriana Tuberquia-Sierra DA-J. Actividad in Vitro De Bacterias Endófitas Fijadoras De. *Agron Mesoam*. 2014;25(2):213-223.
2. Follmi K. The phosphorus cycle, phosphogenesis and marine phosphate-rich deposits. *Earth-Science Rev*. 1996;40(1-2):55-124. doi:10.1016/0012-8252(95)00049-6.
3. Correll DL. The Role of Phosphorus in the Eutrophication of Receiving Waters: A Review. *J Environ Qual*. 1998;27(2):261. doi:10.2134/jeq1998.00472425002700020004x.
4. Niu YF, Chai RS, Jin GL, Wang H, Tang CX, Zhang YS. Responses of root architecture development to low phosphorus availability: A review. *Ann Bot*. 2013;112(2):391-408. doi:10.1093/aob/mcs285.
5. Pineda M. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. 2014;15:101-113.
6. Kaur G, Reddy MS. Effects of Phosphate-Solubilizing Bacteria , Rock Phosphate and Chemical Fertilizers on Maize-Wheat Cropping. *Pedosph An Int J*. 2015;25(3):428-437. doi:10.1016/S1002-0160(15)30010-2.
7. Baken S, Verbeeck M, Verheyen D, Diels J, Smolders E. Phosphorus losses from agricultural land to natural waters are reduced by immobilization in iron-rich sediments of drainage ditches. *Water Res*. 2015;71:160-170. doi:10.1016/j.watres.2015.01.008.
8. Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai W-A, Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol*. 2006;34(1):33-41. doi:10.1016/j.apsoil.2005.12.002.
9. Babalola OO. Beneficial bacteria of agricultural importance. 2010:1559-1570.

doi:10.1007/s10529-010-0347-0.

10. Alikhani H a., Saleh-Rastin N, Antoun H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant Soil*. 2006;287(1-2):35-41. doi:10.1007/s11104-006-9059-6.
11. Liu Z, Li YC, Zhang S, et al. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Appl Soil Ecol*. 2015;96:217-224. doi:10.1016/j.apsoil.2015.08.003.
12. Fern C. Phosphate solubilizing bacteria : Effect on red argentine soil p forms and uptake by orange tree. 2015;(September 2016).
13. Liu F, Liu H, Zhou H, Dong Z. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut ( *Areca catechu* ) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils. 2014:927-937. doi:10.1007/s00374-014-0913-z.
14. Panhwar QA, Jusop S, Naher UA, Othman R, Razi MI. Application of potential phosphate-solubilizing bacteria and organic acids on phosphate solubilization from phosphate rock in aerobic rice. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:272409. doi:10.1155/2013/272409.
15. Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alam S, Latif F. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pakistan J Biol Sci*. 2004;7(2):187-196.
16. Tamar Zohary, Assaf Sukenik TBAN. *Lake Kinneret, Chapter 20 The Phosphorus Cycle*. Vol 53.; 2013. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
17. Mehta P, Walia A, Kulshrestha S, Chauhan A, Shirkot CK. Efficiency of plant growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for enhancement of tomato growth under net house conditions. *J Basic Microbiol*. 2014;(c):33-44. doi:10.1002/jobm.201300562.



18. Restrepo-franco GM, Marulanda-moreno S, Fe-pérez Y De. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. 2015;46(1):63-76.
19. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv.* 1999;17(4-5):319-339. doi:10.1016/S0734-9750(99)00014-2.
20. Hinsinger P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as effected by root-induced chemical changes A review. *Plant Soil.* 2001;237:173-195. doi:10.1023/A:1013351617532.
21. Bolan NS. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil.* 1991;134(2):189-207. doi:10.1007/BF00012037.
22. Paredes-Mendoza M. Aislamiento y Caracterización de Rhizobacterias PO4 Solubilizadoras. *Thesis.* 2010.  
<http://www.colpos.mx/portal/corp/flash/Convocatoria Cambio Dir CTab 18nov090001.pdf>.
23. Becerra JM, Quintero D, Martinez M, Matiz A. Characterization of phosphate solubilizing microorganisms isolated from soils planted with cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Rev Colomb Ciencias Hortícolas.* 2011;5(2):195-208.
24. Mao X, Xu X, Lu K, et al. Effect of 17 years of organic and inorganic fertilizer applications on soil phosphorus dynamics in a rice-wheat rotation cropping system in eastern China. *J Soils Sediments.* 2015;15(9):1889-1899. doi:10.1007/s11368-015-1137-z.
25. Mikanova O, Novakova J. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. *Rostl výroba.* 2002;2002(9):397-400. [http://www.cazv.cz/2003/2002/rv9\\_02/mikanova.pdf](http://www.cazv.cz/2003/2002/rv9_02/mikanova.pdf).
26. Bagher M, Nobandegani J, Saud HM, Yun WM. Phylogenetic Relationship of Phosphate Solubilizing Bacteria according to 16S rRNA Genes. 2015;2015.

27. Hunter PJ, Teakle GR, Bending GD. Root traits and microbial community interactions in relation to phosphorus availability and acquisition, with particular reference to Brassica. *Front Plant Sci.* 2014;5(February):27. doi:10.3389/fpls.2014.00027.
28. Parent LE, Parent SÉ, Ziadi N. Biogeochemistry of soil inorganic and organic phosphorus: A compositional analysis with balances. *J Geochemical Explor.* 2014;141:52-60. doi:10.1016/j.gexplo.2014.01.030.
29. Chuang CC, Kuo YL, Chao CC, Chao WL. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biol Fertil Soils.* 2007;43(5):575-584. doi:10.1007/s00374-006-0140-3.
30. Coyne MS. *Microbiología Del Suelo : Un Enfoque Exploratorio.* (Paraninfo, Editorial S. A. 2000, ed.); 2000. doi:10.1007/s11284-012-0932-x.
31. Martínez Á, Marina L, Forero L, Pérez FC. Growth Promotion of *Baccharis macrantha* ( Asteraceae ) by Phosphate Solubilizing Rhizosphere Bacteria. 2015;20(3):121-131.
32. Reed SC, Yang X, Thornton PE. Incorporating phosphorus cycling into global modeling efforts: A worthwhile, tractable endeavor. *New Phytol.* 2015;208(2):324-329. doi:10.1111/nph.13521.
33. Lewis DR, McGechan MB. A Review of Field Scale Phosphorus Dynamics Models. *Biosyst Eng.* 2002;82(3):351-357. doi:10.1006/bioe.2002.0076.
34. Shepherd JG, Kleemann R, Bahri-Esfahani J, et al. The future of phosphorus in our hands. *Nutr Cycl Agroecosystems.* 2016;104(3):281-287. doi:10.1007/s10705-015-9742-1.
35. Paytan A, Mclaughlin K, Paytan A, Mclaughlin K. The Oceanic Phosphorus Cycle. 2007;107(January):563-576. doi:10.1021/cr0503613.
36. Ohtake H, Wu H, Imazu K, Anbe Y, Kato J, Kuroda A. Bacterial phosphonate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. *Resour Conserv Recycl.* 1996;18(1-4):125-134. doi:10.1016/S0921-3449(96)01173-1.

37. Constanza L, Ramírez C, Galvez ZYA, Burbano VEM. Solubilization of phosphates: an important microbial function in plant development. 2014.
38. Requejo MI, Eichler-Löbermann B. Organic and inorganic phosphorus forms in soil as affected by long-term application of organic amendments. *Nutr Cycl Agroecosystems*. 2014;100(2):245-255. doi:10.1007/s10705-014-9642-9.
39. Shen J, Lixing Y, Junling, Zhang. Haigang L, Zhaohai B, Xinping, Chen. Weifeng Z, Fusuo Z. Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiol*. 2011;156(3):997-1005. doi:10.1104/pp.111.175232.
40. DALAL RC. Effect of plant growth and addition of plant residues on the phosphatase activity in soil. 1982;269:265-269.
41. Munera G, Meza D. El Fosforo Elemento Indispensable para la vida vegetal. 2015:52.
42. Gupta N, Sabat J, Parida R, Kerkatta D. Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines. *Acta Bot Croat*. 2007;66(2):197-204. <http://hrcak.srce.hr/17186>.
43. Bobadilla C, Rincón S. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. 2008.
44. Cerón L, Aristizábal F. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Rev Colomb Biotecnol*. 2012;14(1):285-295.
45. Ordoñez YM, Fernandez BR, Lara LS, Rodriguez A, Uribe-Vélez D, Sanders IR. Bacteria with phosphate solubilizing capacity alter mycorrhizal fungal growth both inside and outside the root and in the presence of native microbial communities. *PLoS One*. 2016;11(6):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0154438.
46. Khan MS. *Mycorrhizosphere Interactions for Legume Improvement*. Vol 53.; 2013. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
47. Espinosa D, López L, De La Cruz A. USE OF 16S rRNA GENE FOR CHARACTERIZATION

OF PHOSPHATE-SOLUBILIZING BACTERIA ASSOCIATED WITH CORN. 2003;26(4):285-290.

48. Cordero JE, Ortega-Rodés P, Ortega E. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Rev Colomb Biotecnol.* 2008;X:111-121.
49. Jha CK, A A, BV P, DK M. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses.* Vol 53. (Heidelberg SB, ed.); 2011. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
50. Gyaneshwar P, Parekh LJ, Archana G, et al. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;171(2):223-229. doi:10.1016/S0378-1097(99)00003-8.
51. Bashan Y, Kamnev AA, de-Bashan LE. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: A proposal for an alternative procedure. *Biol Fertil Soils.* 2013;49(4):465-479. doi:10.1007/s00374-012-0737-7.
52. Fernández LA, Zalba P, Gómez M a., Sagardoy MA. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cienc del Suelo.* 2005;23(1):31-37.
53. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;170(1):265-270. doi:10.1016/S0378-1097(98)00555-2.
54. Baziramakenga R, Simard RR, Leroux GD. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biol Biochem.* 1995;27(3):349-356. doi:10.1016/0038-0717(94)00178-4.
55. Ivanova R, Bojinova D, Nedialkova K. Rock Phosphate Solubilization By Soil Bacteria. *Chem Technol.* 2006:297-302.

56. Paredes-Mendoza M, Espinosa-Victoria D. Organic Acids Produced by Phosphate Solubilizing Rhizobacteria : A Critical Review. *Terra Latinoam.* 2009;28.
57. Prada S. Identificación De Ácidos Orgánicos Causantes De La Solubilización De Fósforo Inorgánico Sintetizados Por Actinomicetos Aislados De Suelos En Los Andes Orientales Colombianos. 2013.
58. Angulo VC, Sanfuentes EA. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. 2015;46(4):338-347.
59. Goldstein AH. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects. *Am J Altern Agric.* 1986;1(2):51-57.  
doi:10.1017/S0889189300000886.
60. Banik S, Dey BK. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant Soil.* 1982;69(3):353-364. doi:10.1007/BF02372456.
61. Gyaneshwar P, Naresh Kumar G, Parekh LJ, Poole PS. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* 2002;245(1):83-93.  
doi:10.1023/A:1020663916259.
62. Acevedo E, Galindo-Castañeda T, Prada F, Navia M, Romero HM. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Appl Soil Ecol.* 2014;80(August):26-33.  
doi:10.1016/j.apsoil.2014.03.011.
63. Prieto GC, Prada-Salcedo LD, Cuervo C, Franco-Correa M. Evaluación de la producción de ácidos orgánicos por *Streptomyces* spp. y solubilización de tres fuentes de fósforo por la cepa T3A. (Spanish). *Eval Org acid Prod by Streptomyces spp solubilization three phosphorus sources by strain T3A.* 2015;17(1):111-121.  
doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.41667.
64. Kim KY, Jordan D, Krishnan HB. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol Lett.*

1997;153(2):273-277. doi:10.1016/S0378-1097(97)00246-2.

65. Pérez E, Sulbarán M, Ball MM, Yarzabal LA. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biol Biochem.* 2007;39(11):2905-2914. doi:10.1016/j.soilbio.2007.06.017.