



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

Evaluación de la capacidad de *Azotobacter nigricans* para solubilizar fosfato

Tesis que presenta

Sara Luz Vera García

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA**

Director de Tesis

Dr. Fernando José Esparza García

Ciudad de México

Septiembre 17 del 2018

COMITÉ TUTORIAL

Director de Tesis:

Dr. Fernando José Esparza García

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería-Cinvestav

Asesores:

Dra. Josefina Barrera Cortes

Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva

M. en C. Elvira Ríos Leal

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería-Cinvestav

Dra. Gabriela García Esquivel

Padrón Nacional de Evaluadores (PNE)

M. en C. Felipe Neri Rodríguez Casasola

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN

CRÉDITOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 49 de Ecología Microbiana del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) Unidad Zacatenco.

El desarrollo de esta tesis de Maestría tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca número 455368.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios por haberme acompañado, por ser mi fortaleza y por brindarme una vida llena de felicidad.

Le doy gracias a mis padres Felipe, Rosa Y Margarita por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación y por ser un ejemplo de vida. A mis hermanos por ser parte de mi vida; Víctor por ser un hermano que siempre está ahí escuchándome cuando tengo algo que decirle y ser fuerte. A toda mi familia que además de ser muy grande me apoyan en todo momento.

Al Dr. Esparza por ayudarme en mi desarrollo académico, ser un mentor en la ciencia.

A mis asesoras de tesis por su comprensión y apoyo en las dudas que surgen a lo largo del camino, Dra. Cañizares, Dra. Barrera, Dra. García y Maestra Ríos. Al Ingeniero Felipe Rodríguez por el apoyo, el equipo y los reactivos, brindados para la elaboración de este trabajo.

Al laboratorio 49 por la amistad brindada, a la maestra Margarita, a la maestra Tere por el conocimiento brindado, el apoyo, por estar pendiente y cuidar de nosotros.

A Fernando Castro, por ser una parte muy importante de mi vida, por apoyarme en los buenos y malos momentos, sobre todo por su paciencia y amor, te amo. Así como a su familia que me han apoyado; Mau, Zury, Mauri, Paty, gracias por todo.

A mis compañeros casi hermanos de laboratorio que compartimos desde el material de laboratorio y espacios, Adriana, Julio, Viri, Antonio, Diego. Especialmente a Adriana por ser una compañera excelente apoyándome en todo momento gracia por tu amistad y afecto.

Agradezco a Pablo por ser mi compañero y amigo. Mis compañeros y amigos de generación por ser la mejor generación y les agradezco su amistad y ayuda: Ana, Mony, Iris, José Manuel, Ezequiel, Wendoline, El Abuelo, Pablo y Eddy.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS	9
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCIÓN	17
2. ANTECEDENTES	20
2.1 Azotobacter	22
2.2 Morfología colonial y microscópica	25
2.3 Exopolisacárido (EPS)	27
2.4 Asimilación de fósforo	28
2.5 Ácidos orgánicos	29
2.6 Fijación de nitrógeno	31
2.7 Fosfato inorgánico	32
2.8 Biofertilizantes	33
2.9 Fosfato diamónico (PDA)	33
3. JUSTIFICACIÓN	35
4. HIPÓTESIS	37
5. OBJETIVOS	38
6. METODOLOGIA	39
6.1. Conservación de la cepa <i>Azotobacter nigricans</i>	39
6.2. Cinética de crecimiento de la cepa <i>A. nigricans</i> en medio de Rennie completo (Rennie, 1981)	39
6.3. Crecimiento de un testigo positivo para la solubilización de fosfato por <i>Azotobacter chroococcum</i>	39
6.4. Crecimiento de <i>Azotobacter nigricans</i> en placa con medio PVK (Pikovskaya, 1948) con dos fuentes de carbono	39
6.5. Modificación del medio PVK con verde de bromocresol	40

6.6. Índice de solubilización con glucosa como fuente de carbono.	40
6.7. Índice se solubilización sin fuente de nitrógeno en medio PVK.	40
6.8. Cinética de crecimiento con dos fuentes de carbono.....	41
6.9. Determinación de biomasa.....	41
6.10. Cuantificación de Fosfato Total por medio del <i>kit</i> colorimétrico Hach®	41
6.11. Cuantificación de Nitrógeno Total por medio del <i>kit</i> colorimétrico Hach®.....	42
6.12. Cinética de crecimiento y solubilización de fosfato tricálcico (PTC) con sacarosa	42
6.13. Cuenta poblacional por cámara de Neubauer “Improved”	42
6.14. Modificación del medio Jiang (Jiang <i>et al.</i> , 2003) con verde de bromocresol.....	43
6.15. Tinción de Gram	43
6.16. Cromatografía en capa fina de sílica gel (TLC) para la detección de ácidos orgánicos sintetizados.....	43
6.17. Cinética de crecimiento sin fuente de nitrógeno en el medio Jiang (Jiang <i>et al.</i> , 2003).....	43
6.18. Pruebas para solubilización de fosfato con PDA.	44
6.19. Pruebas para solubilización de fosfato con lodos residuales.....	44
7. RESULTADOS	45
7.1. Conservación de la cepa <i>Azotobacter nigricans</i>	45
7.2. Cinética de crecimiento de la cepa <i>A. nigricans</i> en medio de Rennie completo	45
7.3. Crecimiento en placa con medio PVK (Pikovskaya, 1948) con dos fuentes de carbono	46
7.4. Modificación de PVK con verde de bromocresol.....	47
7.5. Índice de solubilización con glucosa como fuente de carbono.	49
7.6. Índice se solubilización sin fuente de nitrógeno en medio PVK.	53
7.7. Cinética de crecimiento con dos fuentes de carbono.....	54
7.8. Determinación de biomasa.....	56
7.9. Cinética de crecimiento y solubilización de fosfato tricálcico (PTC) con sacarosa.	57

7.10. Modificación de medio Jiang con verde de bromocresol	59
7.11. Tinción de Gram	62
7.12. Cinética de crecimiento con y sin fuente de nitrógeno en medio Jiang	62
7.13. Cromatografía en capa fina de sílica gel para la detección de ácidos orgánicos sintetizados.	66
7.14. Pruebas para solubilización de fosfato con PDA.	68
7.15. Pruebas para solubilización de fosfato con lodos residuales.....	71
8. DISCUSIÓN	75
9. CONCLUSIONES	81
10. RECOMENDACIONES.....	82
11. REFERENCIAS	83
12. ANEXOS.....	90
ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVO.....	90
ANEXO B. METODOLOGÍA DE HACH®	92
ANEXO C. TABLAS DE RESULTADOS	96
ANEXO D. ARTÍCULO.....	102

ABREVIATURAS

BSP.....Bacterias solubilizadoras de fosfato

PDA.....Fosfato diamónico

EPS.....Exopolisacárido

IS.....Índice de solubilización

N.....Nitrógeno

P.....Fósforo

PVK.....Pikovskaya

PTC.....Fosfato tricálcico

TLC.....Cromatografía en capa fina

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en bacterias solubilizadoras de fosfato.	30
Tabla 2. Índice de solubilización para una concentración de 2.5gL^{-1} de fosfato tricálcico (PTC).....	47
Tabla 3. Índice de solubilización para una concentración de 2.5gL^{-1} de PTC y 0.01grL^{-1} de verde de bromocresol.....	48
Tabla 4. Índice de solubilización de PTC a una concentración de 2.5gL^{-1} con glucosa como fuente de carbono.	50
Tabla 5. Índice de solubilización de PTC a una concentración de 2.5gL^{-1} y 5gL^{-1} con glucosa como fuente de carbono.....	51
Tabla 6. Índice de solubilización de PTC a una concentración de 2.5gL^{-1} y 5gL^{-1} por <i>A nigricans</i> sin fuente de nitrógeno.	53
Tabla 7. Resultados globales, utilizando <i>A. nigricans</i> , todas las cinéticas se incubaron a 28°C y 125rpm.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 1. Ciclo de la vida de <i>Azotobacter vinelandii</i> (Shadoff, 1975).....	23
Figura 2. Micrografía de un quiste maduro de <i>Azotobacter</i> . Su estructura consiste en la capa externa (exina), capa interna (intina), y el cuerpo central con PBH (García-Esquivel, 2001)	24
Figura 3. Biosíntesis de PHB en <i>Azotobacter vinelandii</i> (Sabra <i>et al.</i> , 2001).	25
Figura 4. a) Morfología colonial del microorganismo <i>Azotobacter chroococcum</i> y b) microscópica observada a 100x.....	26
Figura 5. a) Morfología colonial del microorganismo <i>Azotobacter nigricans</i> y b) microscópica observada a 100x.....	26
Figura 6. Esquema de la principal vía de biosíntesis del biopolímero en <i>Azotobacter</i> y su exportación a la matriz extracelular. (Gauri <i>et al.</i> , 2012).	28
Figura 7. Bacteria fijadora de nitrógeno de vida libre, fijación de nitrógeno en donde la fuente de carbono proporciona energía suficiente para que la nitrogenasa pueda reducir el nitrógeno atmosférico hasta amonio. (García-Esquivel, 2001) ...	31
Figura 8. a) Fotografía de la población microbiana que constituye al cultivo de <i>Azotobacter nigricans</i> y tinción de Gram observada a 100x	45
Figura 9. <i>A. nigricans</i> mostrando la formación del halo de solubilización de PTC, en medio PVK con sacarosa y a una concentración de 2.5 gL ⁻¹ de PTC, incubado después de 240h a 28°C.....	49
Figura 10. Modificación del pH por <i>A. nigricans</i> en medio PVK con sacarosa, 0.001gL ⁻¹ de verde de bromocresol y 2.5gL ⁻¹ de PTC, después de 240h de incubación a 28°C.	49
Figura 11. Halos de solubilización de A) <i>A. nigricans</i> en medio PVK con verde de bromocresol (0.001gL ⁻¹), glucosa y una concentración de 2.5 grL ⁻¹ PTC. B) <i>A.</i>	

nigricans en medio Jiang con verde de bromocresol (0.001gL^{-1}), glucosa y una concentración de 2.5 grL^{-1} PTC a las 240h de incubación a 28°C 51

Figura 12. Halos de solubilización en placa de A) *A. nigricans*, medio Jiang con glucosa y una concentración de 5 gL^{-1} de PTC B) *A. nigricans*, medio PVK y glucosa con una concentración de 5 gL^{-1} de PTC. Después de 240h (10días) de incubación a 28°C 52

Figura 13. Halos de solubilización de A) *A. nigricans*, medio PVK sin nitrógeno y glucosa con una concentración de 5 gL^{-1} PTC B) *A. nigricans*, medio PVK sin nitrógeno y glucosa con una concentración de 2.5 gL^{-1} PTC. Después de 7 días de incubación a 28°C 54

Figura 14. Medio Jiang con verde de bromocresol 0.001hL^{-1} a las 0h 60

Figura 15. Medio cromógeno con indicador de pH (verde de bromocresol 0.01gL^{-1}) en la cinética a las A) 96h B) 48h y C) 0h, con *Azotobacter nigricans*, observando el viraje del pH con el color con los siguientes valores de pH; A) 4.2, B) 4.6 y C) 6.3. 60

Figura 16. Tinción de Gram de *A. nigricans* del cultivo en medio Jiang con verde de bromocresol: A) 24h, B) 96h, C) 168h observados a 100x..... 62

Figura 17. Cromatografía en capa fina de sílica del (TLC) de ácidos orgánicos sintetizados por *A. nigricans* con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en medio Jiang con sacarosa como fuente de carbono incubados a 28°C con 125rpm y revelados a una longitud de onda de 250nm correspondientes: a) blanco, b) 24h, c) 72h, d) 120h y e) 168h. 66

Figura 18. Cromatografía en capa fina de sílica gel (TLC) de ácidos orgánicos sintetizados con *A. nigricans* sin fuente de nitrógeno, en medio Jiang con sacarosa como fuente de carbono incubado a 28°C con 125rpm y revelados a una longitud de onda de 250nm, correspondiente: a) blanco, b) 24h, c) 72h, d) 120h, e) 168h, f) Testigo, sin nitrógeno. 67

Figura 19. Cromatografía en capa fina de sílica gel (TLC) de ácidos orgánicos sintetizados por *A. nigricans* con PDA como fuente de nitrógeno y fosfato, incubado a 28°C y 125rpm. Los carriles corresponden a: a) Blanco, b) 24h, c) 72h, d) 120h, e) 168h, f) Testigo..... 70

Figura 20. Tinción de Gram de *A. nigricans* del cultivo en PDA incubado a 28°C y 125rpm a: A) 24h, B) 96h, C) 168 h a un aumento de 100x..... 71

Figura 21. Cromatografía en capa fina de sílica gel (TLC) de ácidos orgánicos sintetizados por *A. nigricans* con lodos residuales incubado a 28°C y 125rpm. Los carriles corresponden a: a) Blanco, b) 24h, c) 72h, d) 120h, e) 168h, f) Testigo. .. 73

Figura 22. Tinción de Gram de *A. nigricans* del cultivo de lodos residuales a: A) 24h, B) 96h, C) 168h a un aumento de 100x..... 74

Gráfico 1. Cinética de crecimiento del cultivo de *A. nigricans* en medio de Rennie completo. Llevándose a 125rpm y 28°C. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 7..... 46

Gráfico 2. Índice de solubilización, con sacarosa y manitol como fuente de carbono en medio PVK inóculo por medio de punción en la placa incubándose a 28°C y 30°C por 240h. Los resultados se presentan en el anexo C tabla 8..... 47

Gráfico 3. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, con sacarosa y manitol como fuente de carbono en medio PVK a una concentración de 2.5gL⁻¹ de PTC tricálcico y 0.01grL⁻¹ de verde de bromocresol incubándose a 28°C por 240h. Los resultados se presentan en el anexo C, tabla 9..... 48

Gráfico 4. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, con glucosa en medio PVK y Jiang a una concentración de 2.5gL⁻¹ de PTC tricálcico y 0.01grL⁻¹ de verde de bromocresol incubándose a 28°C por 240h Los resultados se presentan en el anexo C, tabla 10..... 51

Gráfico 5. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, con glucosa y medio PVK y Jiang a una concentración de 2.5gL⁻¹ de PTC y 0.01grL⁻¹

de verde de bromocresol incubándose a 28°C por 240h Los resultados se presentan en el anexo C, tabla 11.....	52
Gráfico 6. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, con glucosa y medio PVK a una concentración de 2.5gL ⁻¹ y 5gL ⁻¹ de PTC sin fuente de nitrógeno, incubándose a 28°C por 240h Los resultados se presentan en el anexo C, tabla 12.....	53
Gráfico 7. Solubilización de PTC por <i>A. nigricans</i> y variación de pH hasta las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 13.....	55
Gráfico 8. Solubilización de PTC por <i>A. nigricans</i> y variación de pH hasta las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con glucosa como única fuente de carbono en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar correspondientes se presentan en el anexo C, tabla 14.....	55
Gráfico 9. Biomasa de <i>A. nigricans</i> con sacarosa como fuente de carbono, en medio Jiang y 2.5gL ⁻¹ de PTC incubando a 28°C y 125rpm. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 13.	56
Gráfico 10. Biomasa de <i>A. nigricans</i> con glucosa como fuente de carbono y 2.5gL ⁻¹ de PTC incubando a 28°C y 125rpm. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 14.....	57
Gráfico 11. Solubilización de PTC a una concentración de 50mgL ⁻¹ por <i>A. nigricans</i> y variación de pH hasta las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono, en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 15.	58
Gráfico 12. Comparación de métodos para crecimiento celular de <i>A. nigricans</i> en PTC a una concentración de 50mgL ⁻¹ a las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono, en medio Jiang. Las cifras obtenidas y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 15.	59

Gráfico 13. Solubilización de PTC a una concentración de 1gL^{-1} por *A. nigricans* y pH a las 168h de incubación a 28°C , 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono en medio Jiang. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 16 61

Gráfico 14. Comparación de métodos para crecimiento celular de *A. nigricans* en PTC a una concentración de 50mgL^{-1} a las 168h de incubación a 28°C , 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono, en medio Jiang. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 16 61

Gráfico 15. Fosfato soluble por *A. nigricans* con una concentración de 1gL^{-1} de PTC con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, incubado a 28°C , 125rpm y con sacarosa como fuente de carbono, en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 17 62

Gráfico 16. Comparación del crecimiento celular para *A. nigricans* en PTC a una concentración de 1gL^{-1} con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno a las 168h de incubación a 28°C , 125rpm y con sacarosa, en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 17. 63

Gráfico 17. Fosfato soluble por *A. nigricans* con una concentración de 1gL^{-1} de PTC sin fuente de nitrógeno, incubado a 28°C , 125rpm y con sacarosa como fuente de carbono, en medio Jiang. Sin nitrógeno Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, Tabla 18. 64

Gráfico 18. Crecimiento celular de *A. nigricans* con una concentración de 1gL^{-1} de PTC sin fuente de nitrógeno, incubando a 28°C , 125rpm y con sacarosa como fuente de carbono, en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 18..... 64

Gráfico 19. Nitrógeno total en el medio Jiang, cuantificado por medio del *kit* colorimétrico Hach®, por *A. nigricans*, incubado a 28°C y 125rpm y sacarosa como fuente de carbono. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 18. 65

Gráfico 20. Fosfato soluble por *A. nigricans* con una concentración de 5gL^{-1} de PDA y 5gL^{-1} de sacarosa. Incubado a 28°C , 125rpm. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 19 68

Gráfico 21. Crecimiento celular de *A. nigricans* con una concentración de 5gL^{-1} de PDA, con sacarosa como fuente de carbono, incubando a 28°C , 125rpm. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 19. 69

Gráfico 22. Nitrógeno total en el medio con PDA y sacarosa como fuente de carbono, cuantificado por medio del *kit* colorimétrico Hach®. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 19 69

Gráfico 23. Fosfato soluble por *A. nigricans* con 25 ml de lodos residuales y una concentración de 5gL^{-1} de PTC, incubado a 28°C , 125rpm con sacarosa como fuente de carbono. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 20. 71

Gráfico 24. Crecimiento celular en medio con lodos residuales de la cepa *A. nigricans* con una concentración de 5gL^{-1} PTC sin fuente de nitrógeno, incubando a 28°C , 125rpm y con sacarosa como fuente de carbono. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 20 72

Gráfico 25. Nitrógeno total en el medio con los lodos residuales con la concentración de 50mgL^{-1} de nitrógeno inicial incubado a 28°C y 125rpm, cuantificado por medio del *kit* colorimétrico Hach®. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 20 73

RESUMEN

El fósforo (P) es un macroelemento esencial para el crecimiento y desarrollo de los seres vivos, su concentración en los suelos es de aproximadamente 0.05% (w/w) sin embargo, únicamente 0.1% del P_{Total} está disponible para su asimilación debido a su baja solubilidad en agua (0.002 g / 100 g) (Munera-Velez y Meza-Sepúlveda, 2012). El P remanente se encuentra en forma de complejos inorgánicos como el fosfato tricálcico (TCP).

Basándose en el crecimiento poblacional y en las demandas nutricionales, Oelkers y Valsami-Jones, (2008), concluyen que la mitad de las fuentes actuales conocidas de P serán consumidas en los próximos 60 o 70 años.

Una alternativa para aumentar la disponibilidad del P en suelos es la solubilización de las formas inorgánicas de éste mediante la implementación de procesos con bacterias solubilizadoras de fosfato (BPS).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de *Azotobacter nigricans* para solubilizar TCP. Se analizó la importancia de la fuente de carbono sobre el índice de solubilización (IS), obteniendo los mejores resultados en medio PVK con glucosa siendo 2.45 y 2.1 para concentraciones de 2.5 y 5 gL⁻¹ de TCP respectivamente. Así mismo se realizó la solubilización de TCP en medio PVK sin fuente de N, alcanzando un IS de 2.25 y 1.85 a concentraciones de 2.5 y 5 gL⁻¹ de TCP, lo que confirma que *A. nigricans* es un microorganismo fijador de nitrógeno (García-Esquivel, 2009). Posteriormente se analizó la solubilización de TCP en medio líquido a una concentración de 1 g L⁻¹ alcanzando concentraciones de 800 y 530 mg de P soluble en presencia y ausencia de fuente de N respectivamente. Para evaluar el potencial de aplicación de *A. nigricans* se realizó la solubilización del P inorgánico presente en un fertilizante comercial (DAP) y en lodo residual enriquecido con TCP, obteniendo un 62 y 32.7% de $(\text{PO}_4)^{3-}$ soluble respectivamente. Finalmente se determinó mediante cromatografía de capa fina (TLC) la presencia de ácidos orgánicos como mecanismo de solubilización de TCP por *A. nigricans*, siendo el ácido málico el de mayor presencia encontrado con esta técnica.

ABSTRACT

Phosphorus (P) is a macroelement essential for the growth and development of living beings, its concentration in soils is approximately 0.05% (w / w) however, only 0.1% of P_{Total} is available for assimilation due to its low solubility in water (0.002 g / 100 g) (Munera-Velez y Meza-Sepúlveda, 2012). The remaining P is in the form of inorganic complexes such as tricalcium phosphate (PTC).

Based on population growth and nutritional demands, Oelkers y Valsami-Jones, (2008), conclude that half of the current known sources of P will be consumed in the next 60 or 70 years.

An alternative to increase the availability of P in soils is the solubilization of the inorganic forms of it through the implementation of processes with phosphate solubilizing bacteria (BPS).

In the present work, the ability of *Azotobacter nigricans* to solubilize PTC was evaluated. The importance of the carbon source on the solubilization index (IS) was analyzed, obtaining the best results in PVK medium with glucose being 2.45 and 2.1 for concentrations of 2.5 and 5 gL⁻¹ of PTC respectively. Likewise, the solubilization of PTC was performed in PVK medium without an N source, reaching an IS of 2.25 and 1.85 at concentrations of 2.5 and 5 gL⁻¹ of PTC, which confirms that *A. nigricans* is a nitrogen-fixing microorganism (García-Esquivel *et al.*, 2009). Subsequently, the solubilization of PTC in liquid medium at a concentration of 1 gL⁻¹ was analyzed, reaching concentrations of 800 and 530 mg of soluble P in the presence and absence of N source, respectively. To evaluate the potential application of *A. nigricans*, the solubilization of inorganic P present in a commercial fertilizer (DAP) and in residual sludge enriched with TCP was performed, obtaining 62 and 32.7% of soluble (PO₄)³⁻ respectively. Finally, the presence of organic acids was determined by means of thin-layer chromatography (TLC) as a mechanism of solubilization of TCP by *A. nigricans*, with malic acid having the highest presence found with this technique.

1. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un elemento catalogado como macroelemento que es esencial para los organismos, tanto en entornos terrestres como acuáticos (Illmer y Schinner, 1992). Después del nitrógeno (N), el P es un nutriente inorgánico necesario para el desarrollo y crecimiento de los organismos vivos. Se trata de un componente esencial de moléculas como RNA, DNA y ATP, así como de los fosfolípidos. El P disponible en el suelo es absorbido por la planta en forma de H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} en suelos ácidos y alcalinos respectivamente (Beever y Burns, 1980). La concentración de las formas de P mencionadas, está regulada por el pH y en la mayoría de los suelos, el P en solución es insuficiente para cubrir los requerimientos de las plantas (Kirkby y Johnston 2008).

La concentración de P en el suelo puede variar, bajas concentraciones del mismo se deben a que el P disponible en el suelo es fácilmente convertido a complejos insolubles, como fosfatos de Fe, Al, Mn ó Ca y Mg en suelos ácidos y alcalinos respectivamente (Torriani-Gorini, 1994). Por lo cual este elemento resulta limitante con mayor frecuencia en el suelo; en promedio su concentración en suelo es de aproximadamente 0.05% (w / w) pero solo el 0.1% del P total está disponible para las plantas (Scheffer y Schachtschabel, 1992).

En el suelo existen distintas fuentes de P que pueden clasificarse como P inorgánico y orgánico. La distribución de estas formas de P en el suelo depende de factores que incluyen al tipo de suelo, pH, actividad microbiana y entradas de fertilizantes (Rooney y Clipson, 2009).

Los microorganismos están generalmente involucrados en procesos que se relacionan con la regulación de P en el suelo y forman parte del ciclo del P; los cuales participan en la solubilización de P inorgánico.

Las formas orgánicas de P en el suelo son principalmente: ácidos nucleicos y fosfolípidos. Este P puede mineralizarse en el suelo por medio de tres grupos de enzimas: las fosfatasas ácidas, alcalinas y fitasas. El P orgánico es desfosforilado por las fosfatasas para poder ser asimilado por las plantas (Pradel y Boquet, 1988).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) particularmente solubilizan tanto fosfato orgánico, como inorgánico (Goldstein *et al.*, 2003).

Distintos trabajos han determinado la capacidad de varios géneros de bacterias para solubilizar fosfato inorgánico, como: fosfato tricálcico, fosfato dicálcico y rocas fosfóricas mediante la producción de ácidos orgánicos.

Existen 13 géneros de bacterias con la capacidad de solubilizar fosfato: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* *Erwinia* (Goldstein, 1986; Rodríguez y Fraga, 1999).

Estos microorganismos que solubilizan fosfato son de gran importancia ya que lo vuelven disponible para su aprovechamiento máximo (Beltrán, 2014). En general, se acepta que el mecanismo más común de solubilización del fosfato mineral es la acción de ácidos orgánicos sintetizados por las BSP (Goldstein, 1995).

Los ácidos orgánicos que solubilizan fosfato son de bajo peso molecular y poseen uno o más grupos carboxilo. Dependiendo de las propiedades de disociación y del número de grupos carboxilo, los ácidos orgánicos tienen carga negativa, por lo que pueden formar complejos con cationes metálicos en solución y favorecen el desplazamiento de aniones de la solución del suelo (Sagoe *et al.*, 1998). Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular, como carbohidratos, péptidos y lípidos (Baziramakenga *et al.*, 1995). Estos ácidos juegan un papel determinante en el ciclo biológico de nutrientes, en la agricultura y los ecosistemas forestales. Los ácidos orgánicos o carboxílicos son sustancias polares capaces de formar puentes de hidrógeno entre sí y con el agua. La mayoría de los ácidos orgánicos producidos por las BSP son alifáticos, es decir, son ácidos no aromáticos.

Debido a que el P es esencial y su concentración en suelo es limitada, diversos investigadores advierten sobre una inminente crisis de P, la producción anual de fósforo procedente de minas es de 20 millones de toneladas métricas, de las cuales 95 por ciento se utiliza en la agricultura y la producción de alimentos, de los cuales alrededor del 40% termina en cuerpos de agua, debido a la erosión de suelos y escurrimientos. En el 2035 el consumo de fósforo sobrepasará la

producción minera y para 2050 las reservas de este elemento se agotarán, lo cual provocará un grave problema de sustentabilidad alimentaria (Cordell *et al.*, 2009, Vaccari, 2009).

La distribución de estas reservas es desigual; sólo cuatro países: Marruecos, China, Sudáfrica y Jordania, controlan el 83 % de las reservas mundiales de fosfatos explotables (Vaccari, 2009). Unido al hecho de que los precios de los fertilizantes fosfóricos se incrementan constantemente, se hace necesaria la búsqueda de alternativas para nuevas fuentes de P.

2. ANTECEDENTES

Algunas bacterias de la rizósfera como *Azotobacter* son capaces de solubilizar fosfato y desempeñan un doble papel en la fijación del nitrógeno en el ciclo de nitrógeno y en el ciclo del fósforo en un ecosistema. El género *Azotobacter*, es un microorganismo diazótrofo y puede sintetizar la enzima fosfatasa alcalina, APasa (EC No. 3.1.3.1) bajo ciertas condiciones de crecimiento para solubilizar el fosfato orgánico (Saha *et al.*, 2014).

La caracterización de la cepa *Azotobacter nigricans*, se realizó en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN en el Departamento de Biotecnología (Laboratorio No. 49 de Ecología Microbiana), siendo esta una bacteria aerobia, Gram negativa e investigando la presencia de dichas bacterias en suelos contaminados con hidrocarburos y su capacidad para utilizarlos como fuente de carbono y energía, se encontró también que es una bacteria fijadora de nitrógeno de vida libre. Estas bacterias usan el queroseno como fuente de carbono y energía para llevar a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico, logrando una remoción de 50% de queroseno en cultivo líquido. (García-Esquivel *et al.*, 2009).

La formación de quistes de *Azotobacter nigricans* durante la remoción de queroseno y la fijación de nitrógeno, se observa por medio de microscopía electrónica de transmisión, resultando a las 24 horas de incubación en cultivo líquido con queroseno, la forma celular predominante es la vegetativa y prequistes, con la máxima actividad de nitrogenasa y mayor remoción de queroseno; los quistes maduros se encontraron a las 192 horas de incubación.

Se demostró la capacidad de *Azotobacter* para fijar nitrógeno atmosférico en suelos contaminados por hidrocarburos (García-Esquivel, 2008).

La capacidad de solubilizar fosfato tricálcico por medio de la acumulación de poly(3-hidroxibutirato) P(3HB) y la actividad de la fosfatasa alcalina (APasa), el crecimiento máximo de la bacteria se observó en la concentración de 0.25% w/v, de fosfato esto se encontró en *Azotobacter chroococcum* que es un buen productor de P(3HB), y muestra capacidad de asimilar fosfato orgánico por la síntesis de la enzima fosfatasa alcalina APasa (Saha, *et al.*, 2014).

A su vez la producción de exopolisacárido (EPS) para la solubilización de fosfatos es importante, ya que con el EPS se tiene una mayor capacidad para la solubilización de P. Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) son capaces de solubilizar el fósforo "no disponible" a través de sus actividades metabólicas, mediante la excreción de ácidos orgánicos que secuestran los iones minerales para convertir a fosfato soluble; la producción de ácidos orgánicos se considera como uno de los factores principales responsables de la disolución de fosfato insoluble a través de la formación de un complejo organometálico o a través de procesos de quelación de metales (Yanmei *et al.*, 2007).

Se han desarrollado trabajos acerca de la producción de biofertilizantes, producidos con microorganismos como: *Azotobacter tropicalis*, *Bacillus subtilis*, que proveen la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos y potasio, lo cual hace que el rendimiento en el crecimiento de vegetales aumente. (Chaveevan *et al.*, 2009)

Una evaluación comparativa se llevó a cabo, dos fijadores de nitrógeno de vida libre comúnmente encontrados en el sistema acuático *Azotobacter* y *Azospirillum* para su uso como biofertilizantes en la acuicultura debido a la importancia de la optimización de la productividad ecológica de la acuicultura de agua dulce. Los niveles de nitrógeno amónico en los medios acuosos en el tratamiento con *Azotobacter* variaron en el intervalo de 2.59 – 34.3lg-N/l y resultó ser significativamente diferente del tratamiento con *Azospirillum* (p <0.05). La población viable de los respectivos fijadores de nitrógeno como unidades formadoras de colonias en medios acuosos en el tratamiento de *Azotobacter* inmovilizado con carbón vegetal varió de 0,39 a 2.48×10^3 c.f.u./ml; la actividad de nitrogenasa en el mismo tratamiento permaneció de manera similar a 8.3 – 12.15nmol de etileno/ml agua/h, seguida del tratamiento de *Azotobacter* inmovilizado con alginato que estaba en 7.2 -11.40nmol de etileno/ml agua/h. Por lo tanto, un mejor rendimiento de *Azotobacter sp.* sobre *Azospirillum sp.*, y de inmovilización de carbón sobre la inmovilización de alginato (Prangya, 2005).

2.1 Azotobacter

El género *Azotobacteraceae* tiene células grandes de 1.5 - 2 µm de diámetro, Gram negativas, que son capaces de fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos. Las cepas pueden crecer a partir de una gran variedad de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos. *Azotobacter* se distingue de otros géneros por la habilidad de formar quistes después del crecimiento exponencial o por inducción con butanol (García-Esquivel, 2008).

Azotobacter es capaz de sintetizar el polímero de reserva intracelular poli-3-hidroxi-β-butyrate (PHB) y la enzima fosfatasa alcalina (APase), la cual degrada el fosfato en iones para aumentar su disponibilidad.

Azotobacter chroococcum, es un microorganismo diazótrofo, es capaz de fijar nitrógeno en suelo y en agua (García-Esquivel, 2008) (Garg *et al.*, 2001) así como solubilizar fosfatos en un sistema acuático, aumentando los niveles de nutrientes en el agua y una mayor producción en acuicultura, tiene el potencial de reducir el uso de fertilizantes químicos (inorgánicos y orgánicos) en estanques o aguas residuales tratadas, de tal manera que se controle la contaminación (Garg *et al.*, 2001).

Las cepas de *Azotobacter* son capaces de acumular poli-β-hidroxi-β-butyrate (PHB) intracelularmente y también sintetizar la enzima fosfatasa alcalina (APasa) y de esta manera solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno. (Saha *et al.*, 2014) (García-Esquivel *et al.*, 2009).

Es aerobia estricta, por lo tanto su inoculación reduce las concentraciones de nitrógeno y fosfatos en aguas de estanque ya que su crecimiento es rápido. (Garg *et al.*, 1998)

Se sabe que las cepas, *Azotobacter chroococcum* y *A. vinelandii* son capaces de solubilizar fosfato en suelo (Saha *et al.*, 2014) (Prangya, 2005) también se sabe que en los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, las bacterias del género *Azotobacter* son capaces de utilizar el queroseno como fuente de carbono y energía para fijar nitrógeno atmosférico (García-Esquivel *et al.*, 2009), y realizar una recuperación del suelo.

Debido a su capacidad para solubilizar dicho compuesto se busca comprobar la capacidad de *Azotobacter nigricans* para solubilizar fosfatos insolubles y orgánicos en el tratamiento biológico de aguas residuales.

Azotobacter puede formar quistes que tienen respiración endógena y resisten a la desecación como las endosporas, pero a diferencia de estas, no son resistentes al calor y no están en estado de “dormancia”, porque oxidan las fuentes de energía exógena. (García-Esquivel *et al.*, 2009)

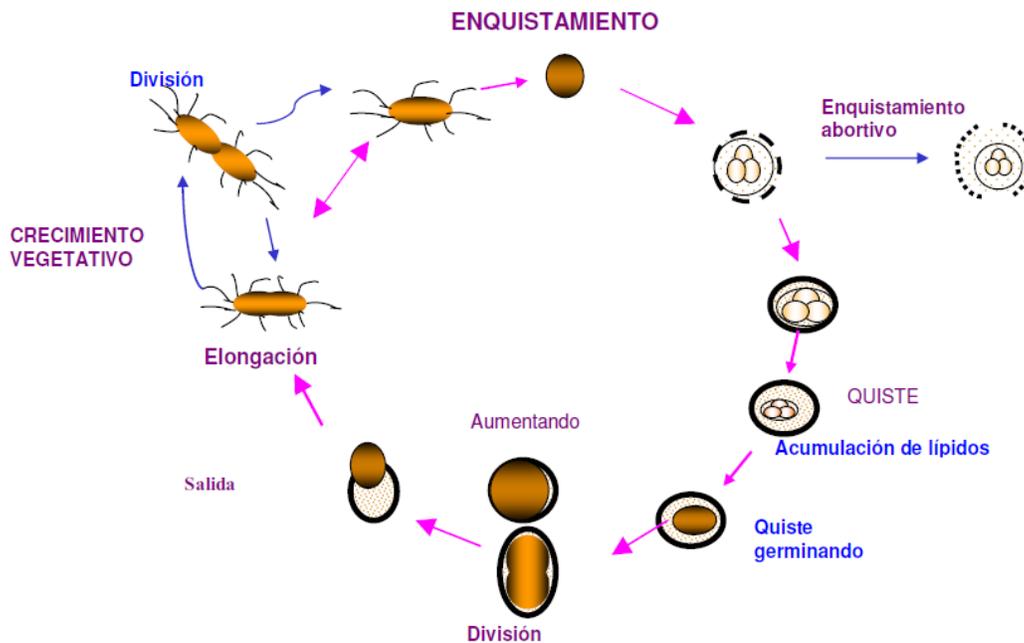


Figura 1. Ciclo de la vida de *Azotobacter vinelandii* (Shadoff, 1975)

En la figura 1, se presenta el ciclo de vida de *Azotobacter vinelandii*, la formación de cápsula es indispensable para formar el quiste, en la cápsula se forman vesículas las cuales se rompen, lo que permite la formación de la capa externa del quiste llamada exina, culminando con la formación de quistes maduros. En el proceso se forma un cuerpo central (fig. 2) el cual presenta una acumulación de lípidos en forma de $\text{poly-}\beta\text{-hidroxibutirato}$ (PHB) Shadoff (1975).

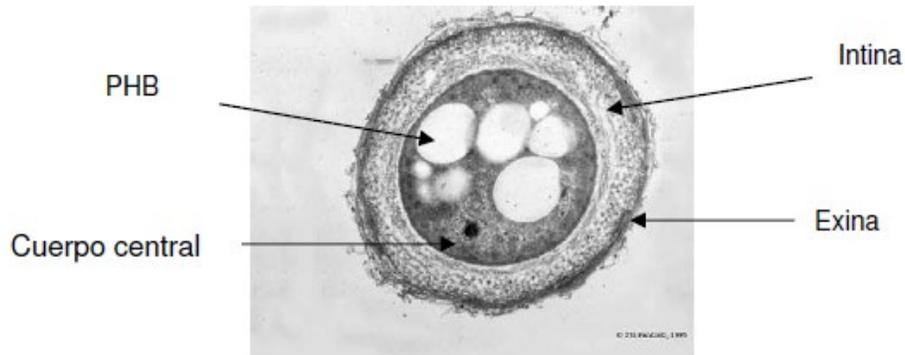


Figura 2. Micrografía de un quiste maduro de *Azotobacter*. Su estructura consiste en la capa externa (exina), capa interna (intina), y el cuerpo central con PBH (García-Esquivel, 2001)

El metabolismo que siguen los azúcares es por medio de la vía de Entner-Doudoroff, la fructosa es metabolizada, los principales productos de esta degradación de azúcares son piruvato y gliceraldehído 3 fosfato, el cual se convierte en piruvato y por cada mol de glucosa, se genera un mol de NADH y una mol de NADPH, además de una mol de ATP. Mientras que la isocitrato deshidrogenasa, es una de las enzimas clave del ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA).

La enzima ácido polimanurónico C-5-epimerasa cataliza la conversión del ácido manurónico en el polímero. La actividad de la enzima depende de los iones de Ca^{+2} . Los grupos acetil se asocian con los residuos de ácido manurónico. El precursor de la biosíntesis de PBH es acetil-CoA formada en el catabolismo de carbohidratos a través de la vía de Entner-Doudoroff (fig. 3). Se sintetiza por la acción de tres enzimas; (a) enzima 3-cetotiolasa, combina dos acetil CoA para formar acetato acetil CoA; (b) acetato acetil CoA reductasa (depende de NADPH), reduce el acetoacetil CoA a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA; (c) (R)-3-hidroxi-butiril CoA, incorpora una cadena polimérica por el ácido polihidroxi-alcanoico (PHA) sintasa (García-Esquivel, 2008).

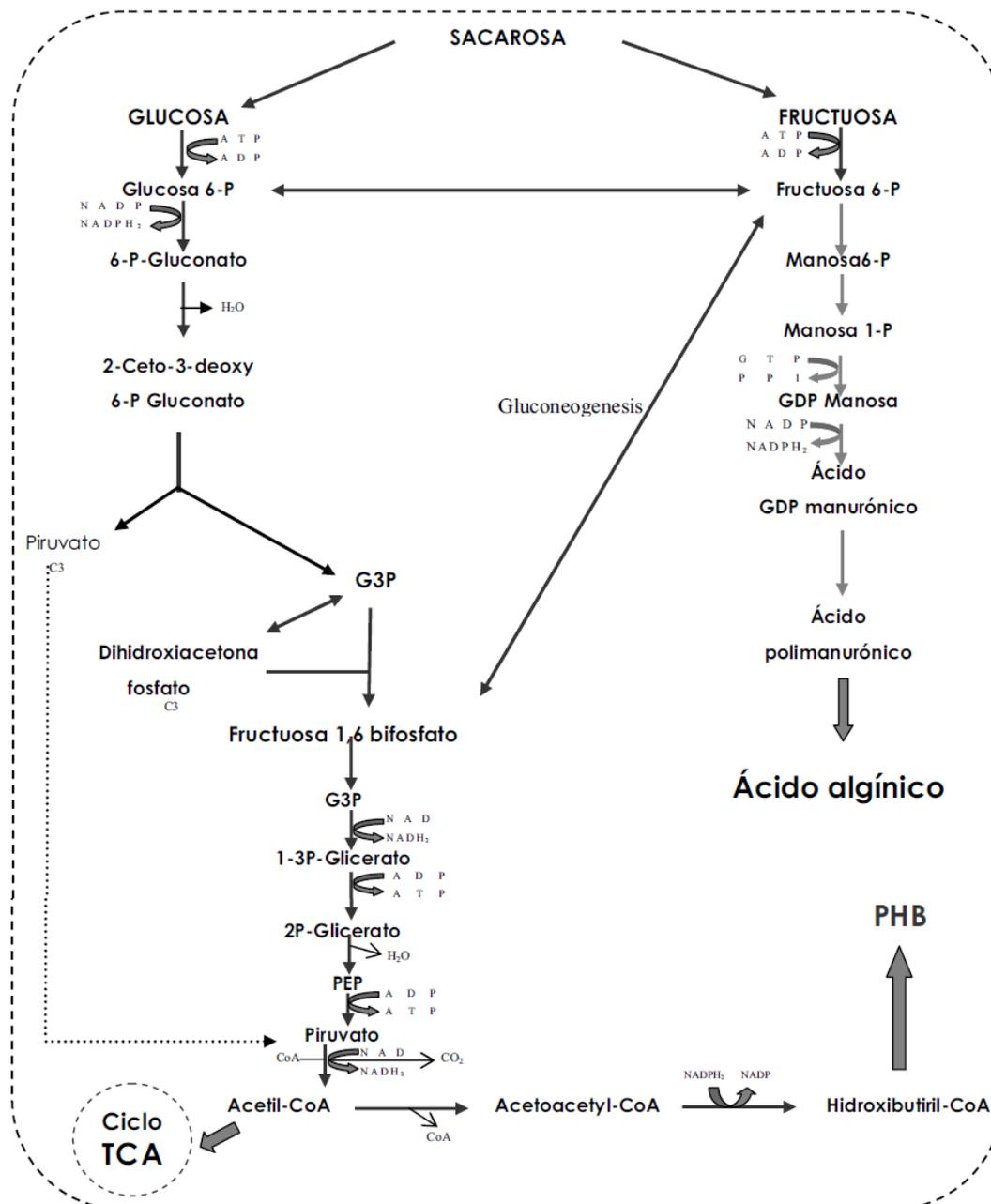


Figura 3. Biosíntesis de PHB en *Azotobacter vinelandii* (Sabra et al., 2001).

2.2 Morfología colonial y microscópica

Azotobacter sp.

Los cultivos crecen a 30°C de 24-48 h. En medios no selectivos como el Agar nutritivo se observan colonias medianas redondas de color crema, convexas de borde circular.

Azotobacter chroococcum

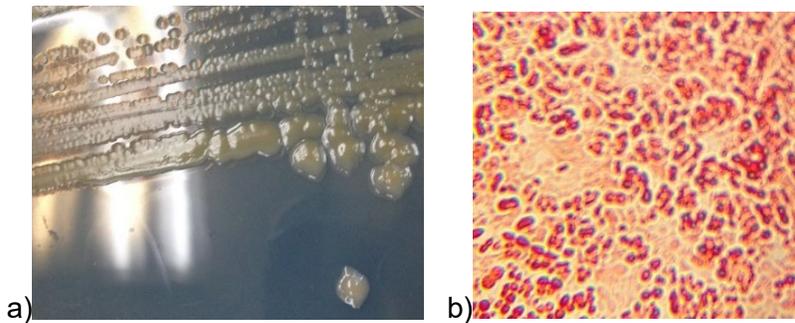


Figura 4. a) Morfología colonial del microorganismo *Azotobacter chroococcum* y b) microscópica observada a 100x.

En su morfología colonial de *Azotobacter chroococcum*, en medio de Rennie completo se observan colonias medianas redondas de color crema, convexas de borde circular y textura butirosa.

Gram negativas, pleomórfica, varía su morfología desde bacilo hasta célula en forma de coco. Se le observa como célula individual, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable.

Azotobacter nigricans

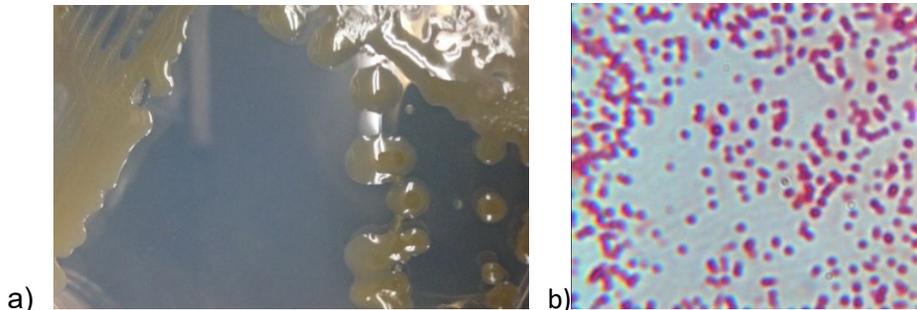


Figura 5. a) Morfología colonial del microorganismo *Azotobacter nigricans* y b) microscópica observada a 100x.

Azotobacter nigricans, en medio de Rennie completo se observan colonias medianas redondas de color crema, de aspecto butiroso, convexas de borde circular.

Gram negativas, pleomórfica, variando su morfología desde bacilo hasta célula en forma de coco. Se le observa como célula individual, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable, después de 48 horas formando un quiste.

2.3 Exopolisacárido (EPS)

Como fue mencionando anteriormente, *Azotobacter* es una bacteria de vida libre, fijador de nitrógeno atmosférico y abundante en la rizósfera y en la región de la filosfera (Garg *et al.*, 2001). Aparte de la aplicación industrial de *Azotobacter*, el alginato desempeña un papel clave en el enquistamiento, para proporcionar protección contra la desecación y la depredación por los protozoos, el ataque de fagos, o afectar la penetración de antimicrobianos y el metal tóxico (Gauri *et al.*, 2012). Este polisacárido también protege la nitrogenasa frente a una alta concentración de oxígeno y también participa en la interacción entre plantas y bacterias.

El EPS sintetizado por *Azotobacter* sp. se caracteriza por estar formado de una familia de exopolisacáridos no ramificados no repetitivos compuestos de diversas cantidades de ácido β -D-mannurónico con enlace (1-4) y su ácido α -L-glucurónico epímero C5 (fig. 6). Estos ácidos de azúcar se distribuyen en bloques de residuos de ácido β -D-manurónico (bloques M) y residuos de ácido α -L-glucurónico (bloques G), o como residuos alternantes (bloques MG), (Rehm, 2005). Este polímero uniforme se modifica adicionalmente mediante acetilación en las posiciones O-2 y / u O-3 y mediante epimerización secuencial.

El papel del alginato como la producción de EPS en ambientes naturales por *Azotobacter* no se conoce bien, pero la integridad estructural y la raíz de la biosíntesis han sido bien definidas.

Estos ácidos azucarados se distribuyen en bloques de residuos de ácido β -D-manurónico continuo (bloques M) y restos de ácido α -L-glucurónico (bloques G), o como residuos alternantes (Gauri *et al.*, 2012).

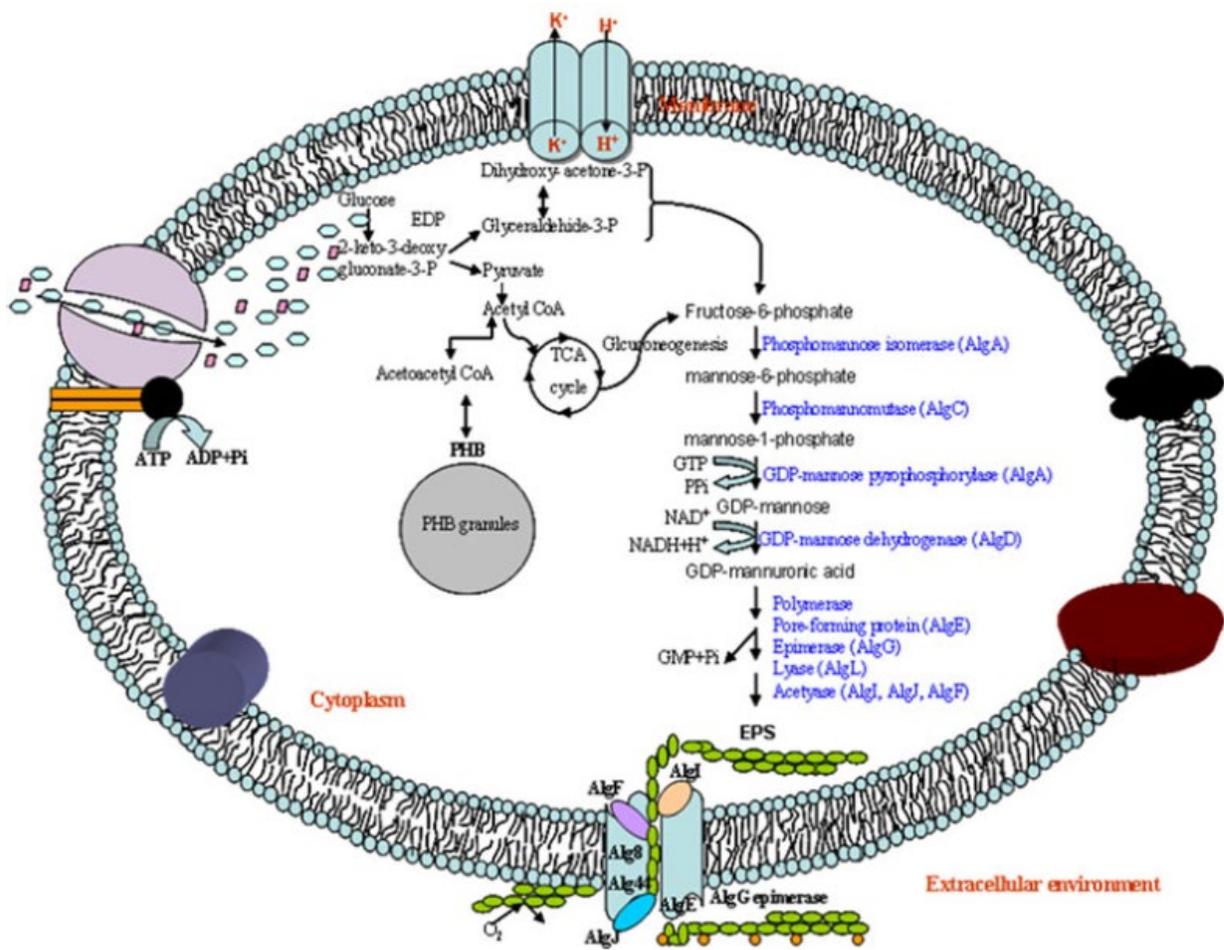


Figura 6. Esquema de la principal vía de biosíntesis del biopolímero en *Azotobacter* y su exportación a la matriz extracelular. (Gauri *et al.*, 2012).

2.4 Asimilación de fósforo

El fósforo se encuentra en ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípidos, ATP y coenzimas como NADP. Las fuentes de fósforo más comunes son el fosfato inorgánico y los ésteres de fosfato orgánico. El fosfato inorgánico se incorpora a través de la formación de ATP de una de tres maneras: por (1) fotofosforilación, (2) fosforilación oxidativa (3) fotosíntesis. El fosfato se une con gliceraldehído 3-fosfato para dar 1,3-bisfosfoglicerato, que se utiliza a continuación en la síntesis de ATP.



Rxn 1.



Rxn 2.

Los microorganismos pueden obtener fosfatos orgánicos de su entorno en forma disuelta o en forma de partículas. Las fosfatasas muy a menudo hidrolizan ésteres orgánicos de fosfato para liberar fosfato inorgánico. Las bacterias Gram-negativas tienen fosfatasas en el espacio periplásmico entre su pared celular y la membrana plasmática, lo que permite que el fosfato se absorba inmediatamente después de la liberación. Por otro lado, los protozoos pueden usar directamente fosfatos orgánicos después de su ingestión o hidrolizarlos en los lisosomas e incorporar el fosfato.

2.5 Ácidos orgánicos

La producción de ácidos orgánicos por los microorganismos es un mecanismo para la solubilización de fosfato en el suelo, lo que hace al fósforo (P) disponible para los demás microorganismos y plantas. Los ácidos orgánicos producidos son de bajo peso molecular y poseen uno o más grupos carboxilo, estos tienen carga negativa y pueden formar complejos con cationes metálicos en solución de forma que pueden desplazar aniones de la solución del suelo (Stevenson, 1967). Tienen acción directa en la acidificación, quelación, precipitación y las reacciones de óxidorreducción en la rizósfera (Kucey *et al.*, 1989).

La acción de los ácidos orgánicos en la solubilización de minerales puede atribuirse a que disminuyen el pH y a la formación de complejos estables con Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} (Illmer y Schinner, 1995).

Se ha reportado la capacidad solubilizadora de fosfatos por los ácidos: oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glucurónico, fumárico, adípico, indolacético y 2-cetoglucónico.

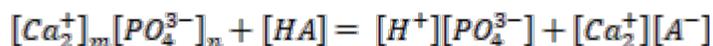
Los ácidos orgánicos incrementan la disponibilidad de micronutrientes, como Fe, Zn y Mn, en el suelo al disminuir el pH en la rizósfera, o por la quelación de estos micronutrientes. De igual manera, los ácidos orgánicos participan en el suelo en

fenómenos como la quimiotaxis microbiana y la detoxificación de metales (Jones *et al.*, 2003).

Tabla 1. Ácidos orgánicos y sus rutas biosintéticas en bacterias solubilizadoras de fosfato.

Ácido	Fórmula	Ruta biosintética
Acético	CH ₃ CO ₂ H	Oxidación incompleta de azúcares (fermentación acética)
Láctico	CH ₃ CHOHCO ₂ H	(Glicolisis) Fermentación láctica primaria
Oxálico	HO ₂ CCO ₂ H	Ácidos tricarboxílicos
Cítrico	HO ₂ CCH ₂ COHCO ₂ HCHO ₂ CO ₂ H	Ácidos tricarboxílicos
Butírico	CH ₃ (CH ₂) ₂ CO ₂ H	Oxidación anaerobia del piruvato
Succínico	HO ₂ CCH ₃ CH ₂ CO ₂ H	Ciclo del glioxilato y ácidos tricarboxílicos
Málico	HO ₂ CCHOHCO ₂ CO ₂ H	Ácidos tricarboxílicos
Glucónico	HO ₂ C(CHOH) ₄ CH ₂ OH	Oxidación directa de la glucosa
Fumárico	CO ₂ CCOCH ₂ CO ₂ H	Ácidos tricarboxílicos

Los fosfatos de calcio son disueltos por la acidificación, por consiguiente, cualquier bacteria que acidifica muestra algún nivel de actividad de solubilización (tabla 1). En la mayoría de los suelos, las reacciones de sustitución del protón se manejan para la producción microbiana de ácidos orgánicos:



RXN. 3

No hay estequiometría para la reacción 3, debido a la complejidad química del fosfato de calcio ya que los ácidos orgánicos que intervienen en el suelo difieren en su número de protones disociables (Goldstein *et al.*, 1993).

2.6 Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es uno de los nutrientes inorgánicos esenciales para la nutrición de las plantas y los microorganismos. La fertilización constituye el principal factor limitante en la producción debido a que los cultivos absorben solo una fracción de los fertilizantes aplicados. La presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, es muy importante para el incremento de la producción agrícola (Boddey y Döbereiner, 1988). Los procariotes son los únicos microorganismos que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Este proceso es efectuado por microorganismos de vida libre o en simbiosis con plantas (Hans, 1990).

La fijación de nitrógeno (N_2) en las bacterias se da de la misma forma que en las bacterias simbióticas, las cuales poseen un complejo enzimático llamado nitrogenasa, solo que las bacterias de vida libre tienen un sistema de protección del oxígeno distinto (fig. 7).

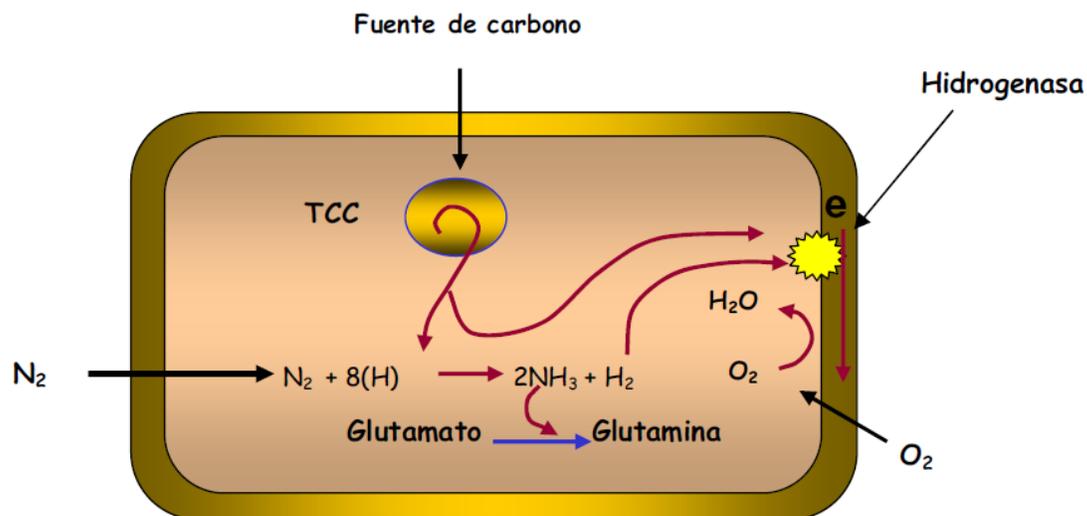


Figura 7. Bacteria fijadora de nitrógeno de vida libre, fijación de nitrógeno en donde la fuente de carbono proporciona energía suficiente para que la nitrogenasa pueda reducir el nitrógeno atmosférico hasta amonio. (García-Esquivel, 2001)

El sistema nitrogenasa produce H_2 , el cual es utilizado por la hidrogenasa que se encuentra ligada a la membrana. La hidrogenasa sirve como un canal de los protones formados para conservar la generación de ATP, mediante la fosforilación oxidativa donde el último aceptor de electrones es el O_2 y por tanto se forma agua, evitando así que el oxígeno llegue a afectar a la nitrogenasa.

2.7 Fosfato inorgánico

El fósforo es un elemento químico de número atómico 15 y símbolo P. Es un elemento no metálico, perteneciente al grupo 15 de la tabla periódica y se encuentra en la naturaleza y en organismos vivos combinado en fosfatos inorgánicos, pero nunca en estado nativo. Es un elemento insoluble en agua, y se oxida espontáneamente en presencia de aire, formando pentóxido de fósforo. Existen varias formas alotrópicas del fósforo, siendo las más comunes el fósforo blanco y el rojo; ambos formando estructuras tetraédricas de cuatro átomos.

El fosfato tricálcico cuya fórmula química es $Ca_3(PO_4)_2$, su peso molecular es de 301.174g mol^{-1} , tiene una apariencia de polvo blanco y es poco soluble en agua: $0.002\text{g}/100\text{g}$.

Como ya se ha comentado anteriormente, parte del fósforo presente en las aguas residuales es insoluble y queda retenido en los procesos de decantación, pasando a formar parte del lodo. Después del tratamiento biológico, el resto del fósforo soluble se encuentra en forma de ortofosfatos. Durante este tratamiento, parte de éste se incorpora a la fracción proteica de las células presentes en los lodos activados y pasa a formar parte del lodo biológico en una proporción del 1% al 2%. Esta incorporación reduce la concentración de fósforo en el agua entre el 15% y el 20%, que sumado a la reducción durante la decantación primaria alcanza un valor del 25 al 30%. La presencia de vertidos industriales con sales trivalentes o de iones de Ca y Mg, pueden incrementar esas cifras por precipitación de fosfatos.

La concentración de fósforo en el agua después de un tratamiento convencional oscila entre 6 y 11mg L^{-1} de P, para disminuir estos valores es necesario recurrir a tratamientos complementarios de eliminación, pudiendo ser estos de tipo fisicoquímico o biológico.

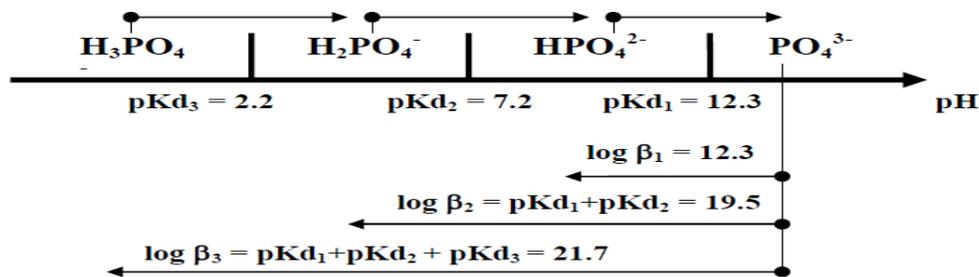


Figura 7.1 .Diagrama de especiación de pK para Fosfatos, (Baeza, 2006).

2.8 Biofertilizantes

Los fertilizantes sintéticos presentan baja eficiencia ($\leq 50\%$) de asimilación por las plantas, el fertilizante no incorporado por las plantas trae un impacto ambiental adverso, tal como contaminación de mantos acuíferos con NO_3^- , eutrofización, lluvia ácida (Keeney, 1982). Una alternativa para frenar esto es el uso de biofertilizantes, preparados con microorganismos aplicados al suelo y/o planta, con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética. (Ramanathan *et al.*, 1985 y Bashan *et al.*, 1996).

2.9 Fosfato diamónico (PDA)

El Fosfato diamónico (PDA) es el fertilizante sólido aplicado directamente al suelo con la más alta concentración de nutrientes primarios, se considera un complejo químico por contar con 2 nutrientes en su formulación. Es una fórmula muy apreciada por los agricultores ya que tiene una relación costo-beneficio muy positiva en cuanto a aporte de nutrientes (64%) y por consiguiente por el costo de la tonelada transportada por concentración de nutrientes (Bermejo, 1980).

La fórmula química es; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ cuyo peso molecular es $132.055 \text{ g mol}^{-1}$ contiene 18%(w/w) de nitrógeno amoniacal y su contenido en fósforo total es de 46% del cual 42% es soluble en agua.

Su uso es debido a la solubilización parcial del fósforo y por lo tanto se disuelve en el suelo para liberar fosfato y amonio disponible para las plantas. Una característica notable del PDA es el pH alcalino que se desarrolla alrededor de los gránulos en disolución. Este daño potencial es más común cuando el pH del suelo es superior a 7, una condición que comúnmente existe alrededor del gránulo del

PDA en disolución. El amonio presente en el PDA es una excelente fuente de N que es convertido gradualmente en nitrato por las bacterias del suelo, resultando en una disminución ulterior del pH. Por lo tanto, el aumento en el pH del suelo alrededor de los gránulos del PDA es un efecto temporal. Este aumento inicial del pH alrededor del PDA puede influir en las reacciones del micro-sitio entre fosfatos y la materia orgánica del suelo (INPI, 2018)

3. JUSTIFICACIÓN

Aunque el fósforo (P) es el undécimo elemento más abundante en la litósfera, es al mismo tiempo, un recurso limitado (Valsami-Jones, 2004). La disponibilidad del fosfato en medio sólido es limitada, ya que, al entrar en contacto con otros elementos como Fe, Ca, Al en suelo alcalino o básico, forma compuestos insolubles (Richardson, 2001); mientras que su capacidad de solubilización en agua es de 0.002 g / 100 g.

Por lo tanto, el P es un elemento limitante y esencial en el ciclo biológico, ya que es utilizado para el crecimiento y en las células para la obtención de energía, en forma de ATP y ADP (Manning, 2008).

El P después del nitrógeno (N), es el elemento más crítico para la producción agrícola; pero su disponibilidad es cada vez más limitada debido a la progresiva insuficiencia de sus fuentes naturales, su relativa escasez edáfica, elevada retención por parte de la matriz del suelo, la falta de reposición natural y su baja movilidad comparada con la de otros nutrientes (Rubio, 2002).

Los microorganismos solubilizadores de fosfato emplean diferentes mecanismos de solubilización, como la producción de ácidos orgánicos, que solubilizan dichos fosfatos insolubles en la zona rizosférica. Los fosfatos solubles son absorbidos por la planta, lo cual mejora su crecimiento y productividad.

Azotobacter es un género que se ha estudiado por su capacidad de solubilización de fosfatos, entre los cuales está el fosfato tricálcico.

La cepa *Azotobacter nigricans* empleada en este trabajo fue aislada de un suelo contaminado con queroseno en Tabasco, la cual es fijadora de nitrógeno atmosférico (García-Esquivel 2001). El presente estudio pretende evaluar la capacidad de *A. nigricans* para solubilizar fosfato tricálcico en un medio sin fuente de nitrógeno, para su posterior consideración como alternativa a la limitada disponibilidad de P tanto en suelo como en agua.

Debido al desequilibrio de los nutrientes en el suelo, la disponibilidad para los microorganismos y las plantas se ve limitada. Al añadir compuestos en forma de fertilizantes se modifica la proporción de nutrientes en el suelo y el pH de éste

cambia; los daños ambientales provocados por su acumulación provocan la eutroficación del suelo.

Aunado a lo anterior, el costo - beneficio de utilizar fertilizantes se refleja en la cantidad que se aplica para obtener un alto rendimiento, lo que a su vez aumenta el costo de producción y el producto final. Por esta razón, el utilizar microorganismos como promotores de crecimiento y capaces de hacer disponibles los nutrientes del suelo, constituye una opción para reducir la aplicación de fertilizantes.

4. HIPÓTESIS

El fosfato tricálcico (PTC) es insoluble en medio líquido así como en medio sólido, utilizando un microorganismo capaz de solubilizarlo y asimilarlo como única fuente de fósforo se presume la solubilización parcial del compuesto en cuestión. En este caso *Azotobacter nigricans* un microorganismo fijador de nitrógeno aislado de la rizósfera, es apto para la solubilización de fosfato tricálcico mediante la acidificación de su microambiente.

5. OBJETIVOS

Objetivo

- Determinación de la capacidad de *A. nigricans* un microorganismo Gram negativo, para solubilizar fosfato.

Objetivos particulares

- Determinación de la capacidad por *A. nigricans* para solubilizar fosfato tricálcico en medio sólido.
- Evaluación de la capacidad por *A. nigricans* para solubilizar el fosfato tricálcico en agua sintética, cuantificado por el *kit* colorimétrico de Hach®.
- Evaluación de la capacidad por *A. nigricans* para solubilizar el fosfato tricálcico en agua sintética con un medio libre de nitrógeno.
- Verificación de la producción de ácidos orgánicos para la solubilización de fosfato inorgánico, por medio de cromatografía de capa fina (TLC).
- Cuantificación de la cantidad de fosfatos solubilizados en lodo residual.
- Cuantificación de la cantidad de fosfatos solubilizados en PDA (Fosfato diamónico).

6. METODOLOGIA

6.1. Conservación de la cepa *Azotobacter nigricans*

La cepa se conservó en tubo inclinado con medio de Rennie completo (Rennie, 1981). El tubo fue sembrado por estría en la superficie e incubado a 28°C por 72h. Después de la incubación se conservan a 4°C. (Anexo A)

6.2. Cinética de crecimiento de la cepa *A. nigricans* en medio de Rennie completo (Rennie, 1981)

Azotobacter nigricans se creció en medio Rennie completo en sólido y líquido, dejándose crecer 24h para inocular 0.5 en la escala de McFarland correspondiente a 1×10^8 células mL⁻¹, para después ser inoculado en medio PVK (Pikovskaya R.I. 1948), (Shekhar C. 1999), y Jiang (Jiang H.L, et. al. 2003) (Anexo A).

La incubación se llevó a 28°C por 120h, con una agitación de 125rpm, para los medios líquidos.

6.3. Crecimiento de un testigo positivo para la solubilización de fosfato por *Azotobacter chroococcum*

La cepa *Azotobacter chroococcum* se adquirió de la CDBB con el número de identificación CBBB-B-1884. Se creció en medio Rennie completo en sólido y líquido, para después ser sembrada en placa en medio PVK y Jiang.

La incubación se llevó a 28°C, para los medios sólidos y con una agitación de 125rpm para los medios líquidos. Todos los medios solidos se realizaron con agua desionizada para eliminar fuentes externas de fosforo.

6.4. Crecimiento de *Azotobacter nigricans* en placa con medio PVK (Pikovskaya, 1948) con dos fuentes de carbono

Las dos cepas *A. nigricans* y *A. chroococcum* se crecieron en placa con medio PVK con dos fuentes de carbono, una concentración de 2.5g L⁻¹ de PTC y midiendo el halo de solubilización a las 240h.

- a) Sacarosa
- b) Manitol

Se inoculó por medio de punción en la placa. Las placas se incubaron a 28°C y 30°C por 240h.

Se calculó el índice de solubilización con la siguiente fórmula (Eddi-Premono *et al.* 1996):

$$IS = \frac{\text{Diámetro de colonia} + \text{Diámetro del halo}}{\text{Diámetro de colonia}}$$

ec. 1

6.5. Modificación del medio PVK con ve de bromocresol

Se realizó una modificación al medio PVK agregando 0.01grL⁻¹ para observar el viraje de pH ácido. Las dos cepas en placas con dos fuentes de carbono, una concentración de fosfato tricálcico (PTC) de 2.5gL⁻¹ y midiendo el halo de solubilización a las 240h.

- a) Sacarosa
- b) Manitol

Se inoculó *A. nigricans* por medio de punción en la placa. Las placas se incubaron a 28°C por 240h (10 días).

6.6. Índice de solubilización con glucosa como fuente de carbono.

Con ambos medios de cultivo PVK y Jiang se realizaron placas con una concentración de PTC de 2.5gL⁻¹, colorante de verde de bromocresol (0.01gL⁻¹) y glucosa como única fuente de carbono. Con las cepas *A. nigricans* y *A. chroococcum*.

Posteriormente con una concentración de PTC de 5gL⁻¹ se midió el índice de solubilización

Se inoculó *A. nigricans* por medio de punción en la placa. Las placas se incubaron a 28°C por 240h (10 días).

6.7. Índice se solubilización sin fuente de nitrógeno en medio PVK.

En medio PVK con concentración de PTC de 2.5gL⁻¹ y 5gL⁻¹ sin fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono; con el fin de comprobar la capacidad de fijación de nitrógeno por *A. nigricans*. Midiendo el índice de solubilización a las 240h.

Se inoculó *A. nigricans* por medio de punción en la placa. Las placas se incubaron a 28°C por 240h (10 días).

Todos los medios solidos se realizaron con agua desionizada para eliminar fuentes externas de fósforo.

6.8. Cinética de crecimiento con dos fuentes de carbono

En medio Jiang con 5gL^{-1} de PTC, se prepararon matraces de 125ml con 25ml de medio, se inoculó con 1ml del cultivo microorganismo *A. nigricans*, con:

- a) Sacarosa
- b) Glucosa

Como fuente de carbono. Se realizó por duplicado y tomando dos matraces cada 24h.

Se incubaron a 28°C por 168h y con una agitación de 125rpm, para los medios líquidos. Todos los medios para las cinéticas se realizaron con agua desionizada para eliminar fuentes externas de fósforo.

6.9. Determinación de biomasa

Con el inóculo de 2ml del cultivo, se realizó la cinética de 168h tomando dos matraces cada 24h, se filtró la biomasa y el fosfato remanente, con un filtro de tamaño de poro $0.45\mu\text{m}$. las membranas se sometieron a 50°C para obtener peso seco. El sobrenadante se sometió a cuantificación de fosfato y nitrógeno por el *kit* de Hach®.

6.10. Cuantificación de Fosfato Total por medio del *kit* colorimétrico Hach®

Método de la digestión del molibdovanadato con persulfato de ácido (No. 10127), rango de prueba $1.0 - 100\text{mgL}^{-1} \text{PO}_4^{3-}$ (HR) (Water Analysis Handbook. 2013)

Los fosfatos presentes en formas orgánicas y condensadas inorgánicas (meta-, piro- u otros polifosfatos) deben convertirse en ortofosfato reactivo antes del análisis. El pretratamiento de la muestra con ácido y calor proporciona las condiciones para la hidrólisis de las formas inorgánicas condensadas. Los fosfatos orgánicos se convierten en ortofosfatos por calentamiento con persulfato ácido. El ortofosfato reacciona con molibdato en un medio ácido para producir un complejo mixto fosfato / molibdato. En presencia de vanadio, se forma el ácido molibdovanadofosfórico amarillo. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfato. Los resultados de la prueba se miden en un espectrofotómetro a 420nm.

La precisión del método es de un 95% en el intervalo de confianza.

6.11. Cuantificación de Nitrógeno Total por medio del *kit* colorimétrico Hach®

Método de digestión de persulfato (No. 10072), rango de prueba 2 – 150mgL⁻¹ N₂ (Water Analysis Handbook. 2013).

Una digestión alcalina de persulfato convierte todas las formas de nitrógeno en nitrato. Se añade metabisulfito sódico después de la digestión para eliminar interferencias de óxido de halógeno. El nitrato reacciona entonces con el ácido cromotrópico en condiciones muy ácidas para formar un color amarillo. Los resultados de la prueba se miden en un espectrofotómetro a 420nm. La precisión del método es de un 95% en el intervalo de confianza.

6.12. Cinética de crecimiento y solubilización de fosfato tricálcico (PTC) con sacarosa

Se prepararon 14 matraces Erlenmeyer de 125ml con medio Jiang y una concentración de 50mgL⁻¹ de PTC, con sacarosa como única fuente de carbono.

Realizándose por duplicado y tomando dos matraces como muestra cada 24h.

Se incubaron a 28°C por 168h y con una agitación de 125rpm, para los medios líquidos.

6.13. Cuenta poblacional por cámara de Neubauer “Improved”

El cubreobjetos es un cuadrado de cristal de aproximadamente 22mm x 22mm. Debe colocarse sobre la cámara de recuento de forma que cubra la parte central de la cámara, delimitando un espacio entre la cámara y el cubreobjetos de 0,1mm.

Posterior mente se agrega la muestra y se observa en el microscopio a un aumento de 100x, se hace recuento de células de 5 cuadrantes de la cámara y con la siguiente fórmula se calcula el número de células por mililitro:

$$\frac{\#celulas}{2} * 50,000 * Dilución = Celulas ml^{-1}$$

ec. 2

6.14. Modificación del medio Jiang (Jiang *et al.*, 2003) con verde de bromocresol

En matraces Erlenmeyer de 125ml se adiciono 25ml medio de Jiang con verde de bromocresol a una concentración de 0.01gL⁻¹ y un 1gL⁻¹ de PTC de, se inoculó con 2ml del cultivo de *A. nigricans*, equivalentes a 0.5 en la escala McFarland (10⁸ UFC/ml) incubando 28°C, a 125rpm por 168h.

6.15. Tinción de Gram

A una muestra del cultivo de *A. nigricans* en medio de Jiang, se le realizó la tinción de Gram cada 24h para observar el estadio del crecimiento del microorganismo y pureza.

6.16. Cromatografía en capa fina de sílica gel (TLC) para la detección de ácidos orgánicos sintetizados.

Se utilizó cromatografía en capa fina para la detección de ácidos orgánicos producidos en el medio con una fase móvil compuesta de: isopropanol - amonio – agua a una proporción de 70:20:10, posterior mente revelándose con luz ultravioleta (250nm) (Baziramakenga *et al.*, 1995) observando así la producción de ácidos orgánicos durante el tiempo experimental.

De acuerdo a la siguiente formula se calculó el RF de la mancha y por reporte de Bajpai *et al.*, (1971) se identificó el ácido orgánico.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}} \quad \text{ec. 3}$$

6.17. Cinética de crecimiento sin fuente de nitrógeno en el medio Jiang (Jiang *et al.*, 2003)

En matraces Erlenmeyer de 125ml se adicionaron 25ml medio Jiang con y sin fuente de nitrógeno, a una concentración de PTC de 1gL⁻¹, se inoculó con 2ml equivalentes a 0.5 en la escala McFarland (10⁸ UFC/ml) de *A. nigricans* incubando 28°C, a 125rpm por 168h., con sacarosa (5gL⁻¹) como fuente de carbono.

6.18. Pruebas para solubilización de fosfato con PDA.

En matraces Erlenmeyer de 125ml se adicionaron 25ml del medio Jiang con una concentración de 5gL^{-1} de DAP; con y sin fuente de nitrógeno, se inocularon con 2 ml de un cultivo de 24 h de edad del microorganismo *A. nigricans*, equivalentes a 0.5 en la escala McFarland (10^8 UFC/ml. Incubando 28°C , 125 rpm por 168 h, con sacarosa (5gL^{-1}) como fuente de carbono.

6.19. Pruebas para solubilización de fosfato con lodos residuales.

Se adicionaron 25 ml de lodos residuales a matraces Erlenmeyer de 125 ml en condiciones de esterilidad, enriquecidos con una concentración conocida de 5gL^{-1} PTC, con 5gL^{-1} de sacarosa como fuente de carbono y sin fuente de nitrógeno, se inocularon con 2 ml de un cultivo de 24 h de edad del microorganismo *A. nigricans*, equivalentes a 0.5 en la escala McFarland (10^8 UFC/ml). Incubando a 28°C , a 125 rpm por 168 h, con sacarosa (5gL^{-1}) como fuente de carbono.

La muestra de lodos se tomó del sedimentador secundario de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales "San Juan de Aragón", trata aguas industriales y domésticas, su capacidad instalada es de 500Ls^{-1} , el caudal tratado 80Ls^{-1} , el cuerpo receptor o reúso son para el Lago de San Juan de Aragón y riego de áreas verdes.

7. RESULTADOS

7.1. Conservación de la cepa *Azotobacter nigricans*

El microorganismo se conservó en tubos de agar inclinado y se comprobó su pureza en placas de Rennie completo, posteriormente se identificó mediante morfología colonial, evidenciándose que se trata de colonias de 2 mm de diámetro, de aspecto butiroso, convexas, de forma circular. Posteriormente, se realizó una tinción de Gram resultando Gram negativa, con morfología desde bacilo hasta célula en forma de coco. Se le observa como célula individual, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable y después de 48h, formando un quiste (fig. 5).

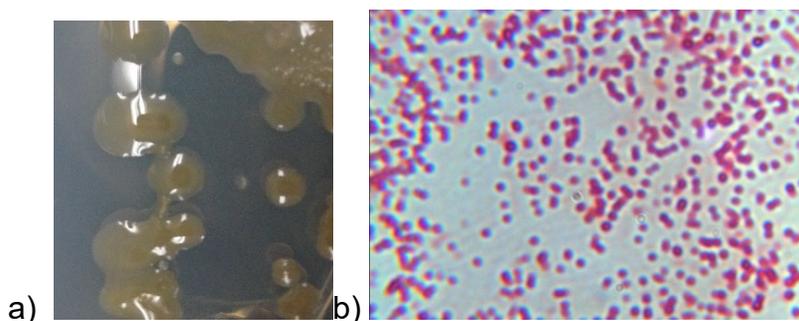


Figura 8. a) Fotografía de la población microbiana que constituye al cultivo de *Azotobacter nigricans* y tinción de Gram observada a 100x

7.2. Cinética de crecimiento de la cepa *A. nigricans* en medio de Rennie completo

El crecimiento de *A. nigricans* en medio de Rennie completo, se muestra en el gráfico 1, donde se presenta la cinética de crecimiento de *A. nigricans*, el cual alcanzó una concentración de biomasa en base seca, de 4100mgL^{-1} a las 72h, a las 24h su biomasa fue de 2011mgL^{-1} , siendo a las 24h utilizando como inóculo para los siguientes experimentos correspondiente a $1 \cdot 10^8$ células ml^{-1} .

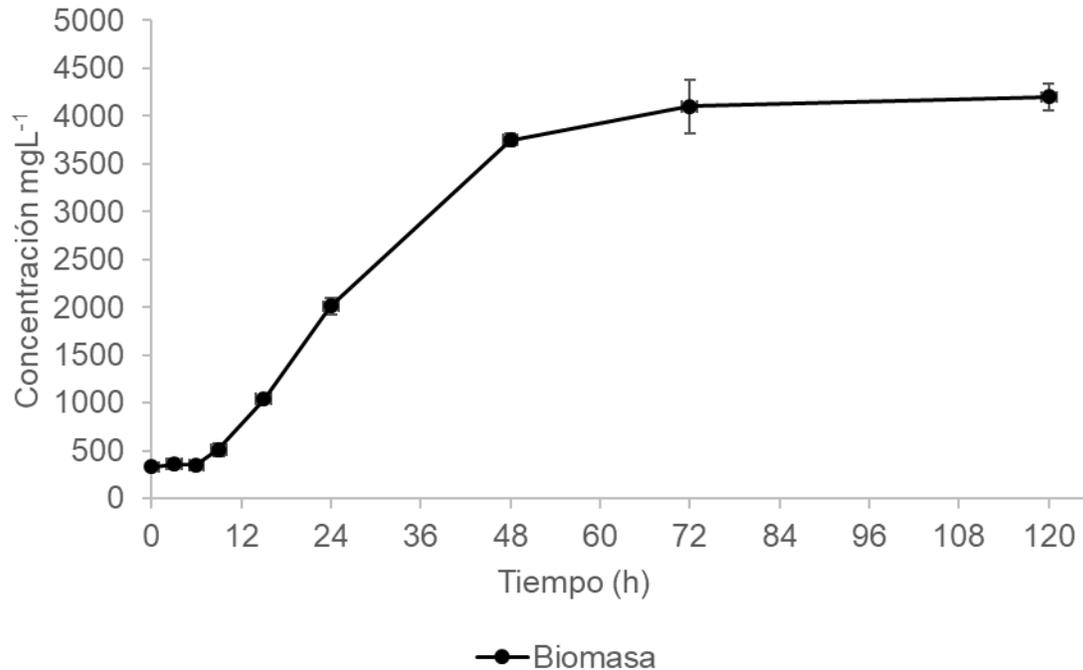


Gráfico 1. Cinética de crecimiento del cultivo de *A. nigricans* en medio de Rennie completo. Llevándose a 125rpm y 28°C. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 8.

7.3. Crecimiento en placa con medio PVK (Pikovskaya, 1948) con dos fuentes de carbono

Las cepas *A. nigricans* y *A. chroococcum* se crecieron en placa con medio PVK con una concentración de fosfato tricálcico (PTC) de 2.5gL⁻¹ midiendo el halo de solubilización para obtener el índice de solubilización (IS) con la siguiente formula: (Eddi-Premono *et al.* 1996).

$$IS = \frac{\text{Diámetro de colonia} + \text{Diámetro del halo}}{\text{Diámetro de colonia}}$$

ec. 1

- a) Sacarosa
- b) Manitol

En la Tabla 2, se muestran los resultados de la prueba con 2.5 gL⁻¹ a dos temperaturas obteniendo un índice de 1.48 con sacarosa y uno de 1 con manitol ambos a una temperatura de 28°C con *A. nigricans* y como control *A.*

chroococcum (Saha P *et al.*, 2014), en el gráfico 2 se muestran los índices de solubilización con las dos cepas hasta las 240h.

Tabla 2. Índice de solubilización para una concentración de 2.5gL^{-1} de fosfato tricálcico (PTC)

Cepa	F de C	I.S.(28°C)	I.S.(30°C)
<i>A. nigricans</i>	Sacarosa	1.48	1.22
<i>A. chroococcum</i>	Sacarosa	1	1
<i>A. nigricans</i>	Manitol	1	1
<i>A. chroococcum</i>	Manitol	1.33	1.3

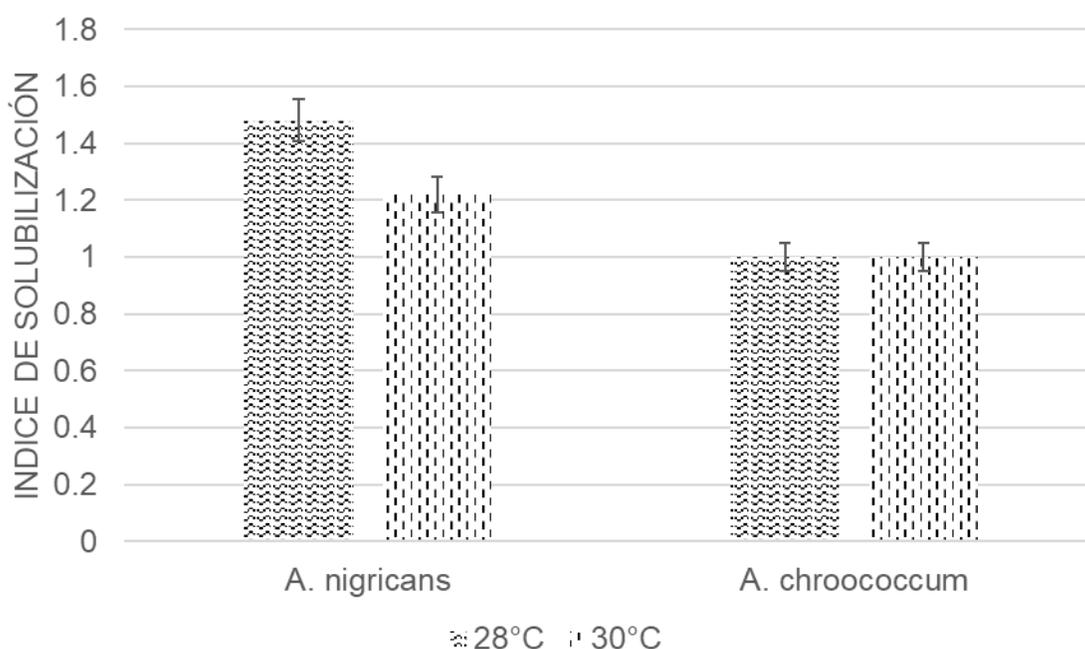


Gráfico 2. Índice de solubilización, con sacarosa y manitol como fuente de carbono en medio PVK inóculo por medio de punción en la placa incubándose a 28°C y 30°C por 240h. Los resultados se presentan en el anexo C tabla 9.

7.4. Modificación de PVK con verde de bromocresol

Para observar de forma visual el cambio de pH en la placa se realizó una modificación al medio PVK agregando 0.01grL^{-1} de verde de bromocresol, las dos fuentes de carbono y una concentración de fosfato tricálcico (PTC) de 2.5gL^{-1}

- a) Sacarosa
- b) Manitol

El verde de bromocresol vira en in pH de 3.8 y 5.4 de amarillo (ácido) y azul (básico), así mismo midiendo el índice se solubilización (IS) con ayuda de la ecuación 1. En la Tabla 3 se muestras los índices de solubilización calculados obteniendo 1.75 a 28°C con Sacarosa, mostrándose en el Grafico 3.

La Figura 9 muestra una fotografía de los halos de solubilización que corresponde a la zona clara alrededor de la colonia.

Tabla 3. Índice de solubilización para una concentración de 2.5gL⁻¹ de PTC y 0.01grL⁻¹ de verde de de bromocresol.

Cepa	F de C	I.S.(28°C)
<i>A. nigricans</i>	Sacarosa	1.75
<i>A. nigricans</i>	Manitol	1.1
<i>A. chroococcum</i>	Sacarosa	1.1
<i>A. chroococcum</i>	Manitol	1.4

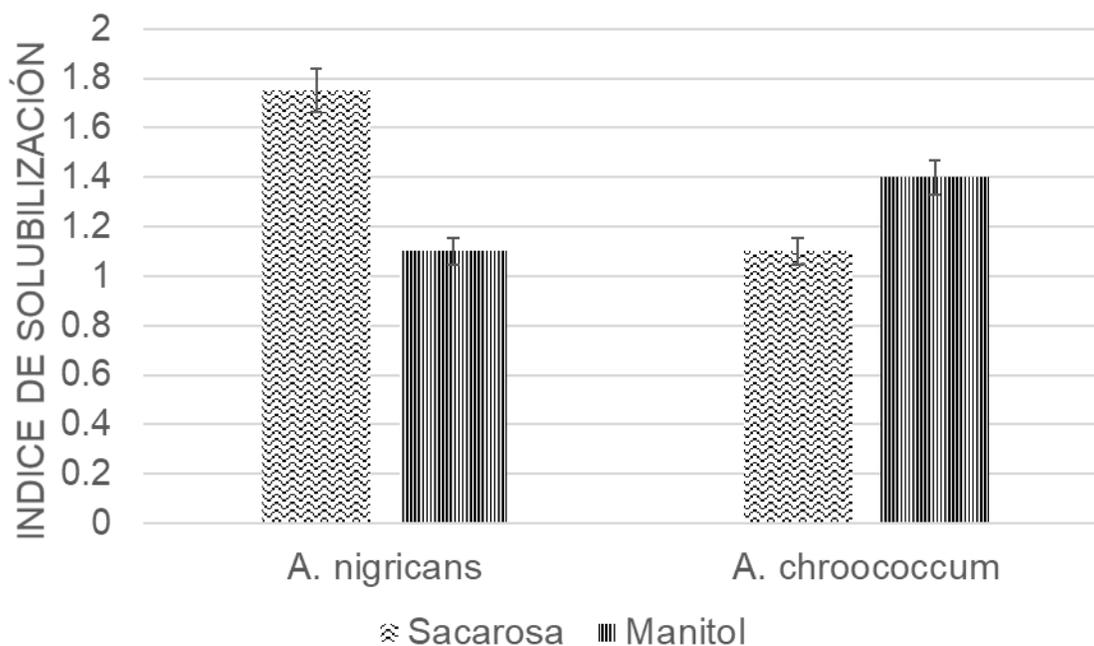


Gráfico 3. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, con sacarosa y manitol como fuente de carbono en medio PVK a una concentración de 2.5gL⁻¹ de PTC tricálcico y 0.01grL⁻¹ de verde de bromocresol incubándose a 28°C por 240h. Los resultados se presentan en el anexo C, tabla 10.

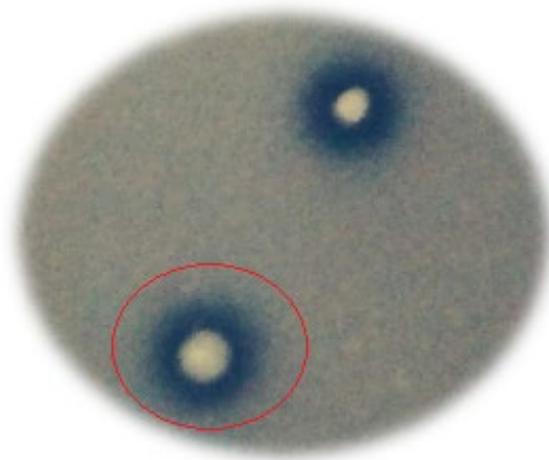


Figura 9. *A. nigrkans* mostrando la formación del halo de solubilización de PTC, en medio PVK con sacarosa y a una concentración de 2.5 gL^{-1} de PTC, incubado después de 240h a 28°C .

En la Figura 10 se observa el viraje a color verde claro debido al pH ácido, producido por *A. nigrkans*, ya que el verde de bromocresol vira a color amarillo a pH ácido.

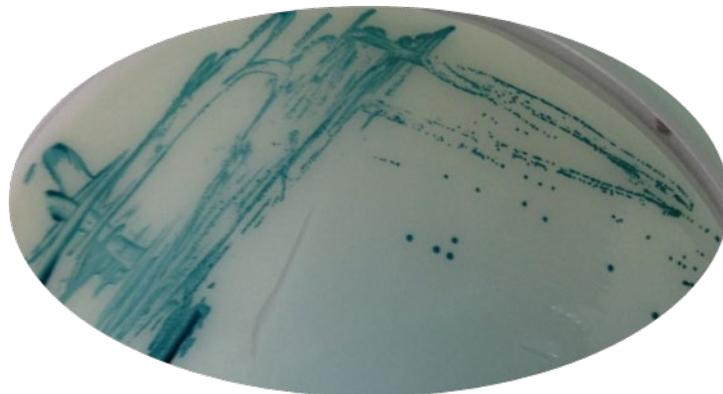


Figura 10. Modificación del pH por *A. nigrkans* en medio PVK con sacarosa, 0.001 gL^{-1} de verde de bromocresol y 2.5 gL^{-1} de PTC, después de 240h de incubación a 28°C .

7.5. Índice de solubilización con glucosa como fuente de carbono.

Nautiyal, (1999) reportó que la fuente de carbono es importante para observar el halo de solubilización ya que la tasa de solubilización de fosfato incrementa con glucosa como fuente de carbono. Utilizando dos medios de cultivo PVK y Jiang con

una concentración de 2.5gL^{-1} y 5gL^{-1} de PTC, colorante de verde de bromocresol (0.01gL^{-1}) y glucosa como única fuente de carbono.

Inoculando las cepas *A. nigricans* y *A. chroococcum* y midiendo el índice de solubilización a las 240h.

Se inocularon las cepas *A. nigricans* y *A. chroococcum* y se midió el índice de solubilización a las 240h.

La tabla 4 muestra los índices de solubilización a la concentración de 2.5gL^{-1} de PTC (Fosfato tricálcico) que fueron de 2.45 con PVK a 28° y con el medio Jiang se obtiene 1.9 a la misma temperatura esta diferencia de 0.55 se debe a la formulación del medio, en el gráfico 4 se muestran los índices de solubilización de ambos medios. En la figura 11 se muestran los halos formados tanto en medio PVK como en medio Jiang.

Tabla 4. Índice de solubilización de PTC a una concentración de 2.5gL^{-1} con glucosa como fuente de carbono.

Medio	Cepa	I.S.(28°C)
PVK	<i>A. nigricans</i>	2.45
Jiang	<i>A. nigricans</i>	1.94
PVK	<i>A. chroococcum</i>	1.9
Jiang	<i>A. chroococcum</i>	1.4

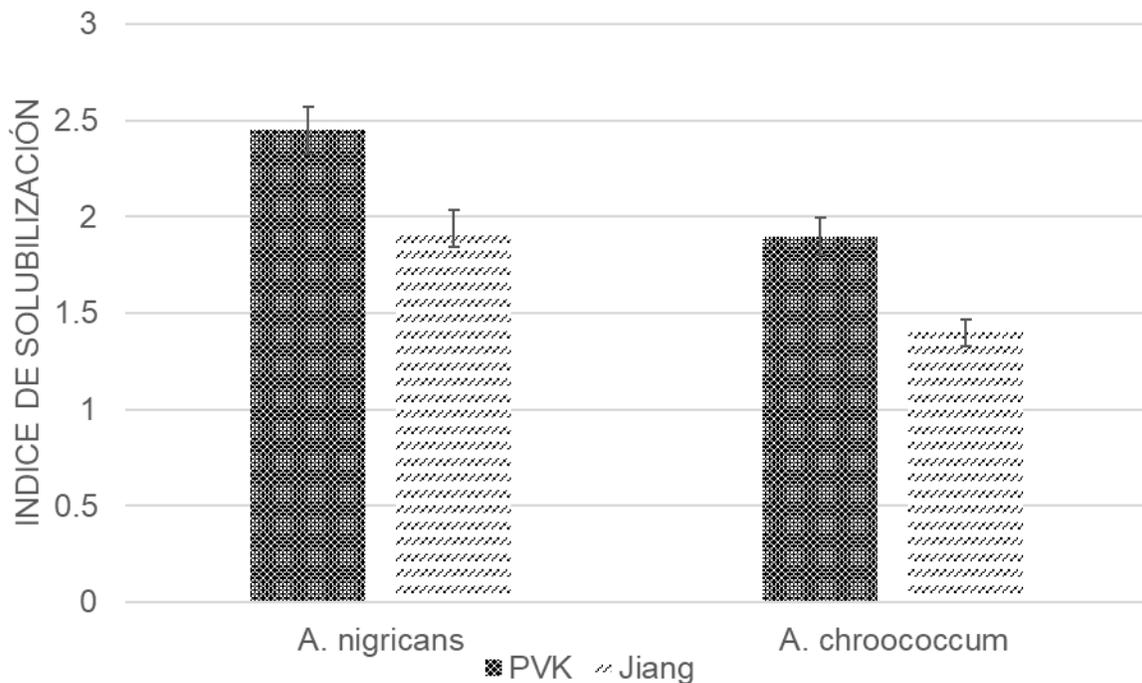


Gráfico 4. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, con glucosa en medio PVK y Jiang a una concentración de 2.5gL⁻¹ de PTC tricálcico y 0.01grL⁻¹ de verde de bromocresol incubándose a 28°C por 240h Los resultados se presentan en el anexo C, tabla 11.

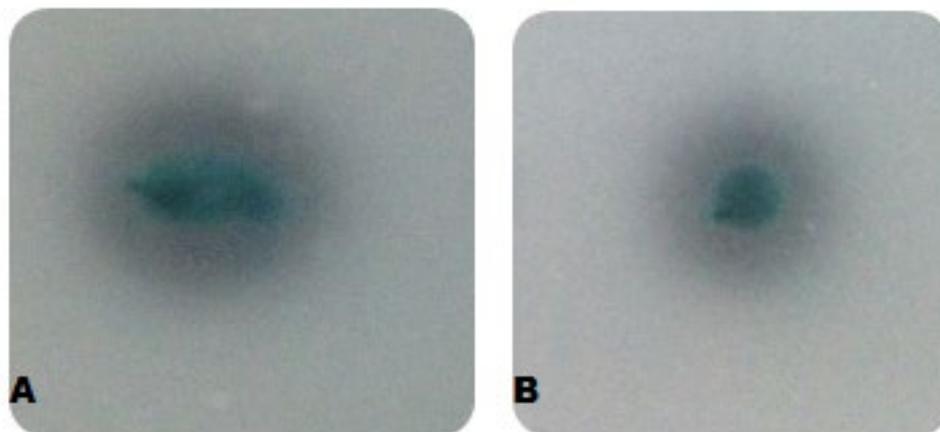


Figura 11. Halos de solubilización de A) *A. nigricans* en medio PVK con verde de bromocresol (0.001gL⁻¹), glucosa y una concentración de 2.5 grL⁻¹ PTC. B) *A. nigricans* en medio Jiang con verde de bromocresol (0.001gL⁻¹), glucosa y una concentración de 2.5 grL⁻¹ PTC a las 240h de incubación a 28°C

Debido a los índices de solubilización con 2.5 gL⁻¹ de PTC se aumenta la concentración al doble 5gL⁻¹ para poder medir estos índices, obteniendo 2.1 con PVK y 1.6 con Jiang como se muestra en la Tabla 5 y en el gráfico 5.

Mostrando en la figura 12 las fotografías de los halos formados a las 240h de incubación.

Tabla 5. Índice de solubilización de PTC a una concentración de 2.5gL⁻¹ y 5gL⁻¹ con glucosa como fuente de carbono.

Medio	Cepa	[PTC] g/L	I.S (28°C)
PVK	<i>A. nigricans</i>	5	2.1
Jiang	<i>A. nigricans</i>	5	1.66

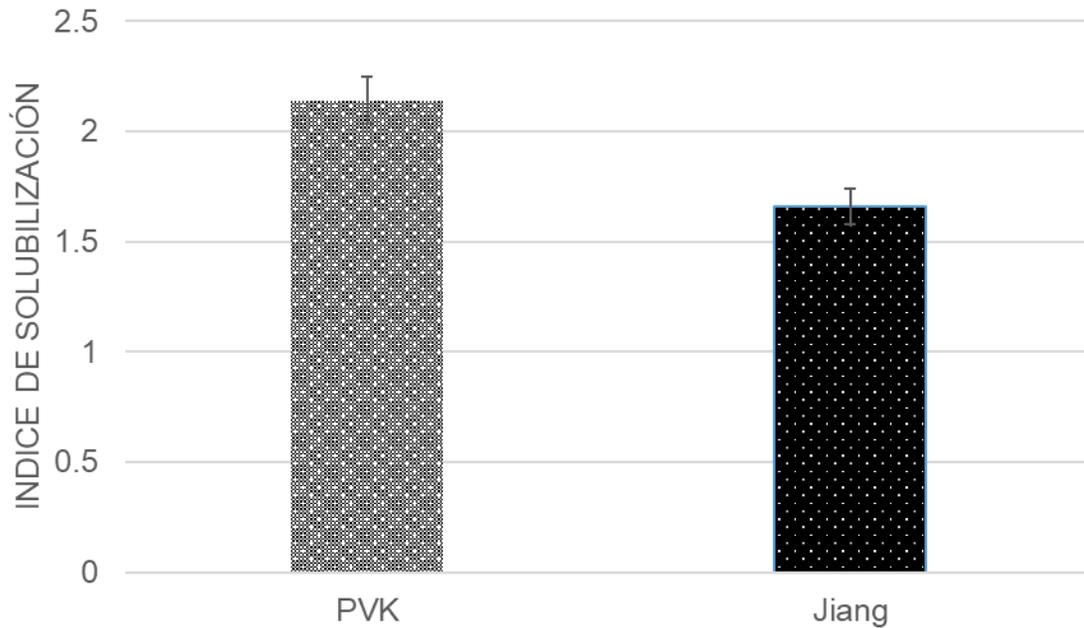


Grafico 5. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, con glucosa y medio PVK y Jiang a una concentración de 2.5gL^{-1} de PTC y 0.01grL^{-1} de verde de bromocresol incubándose a 28°C por 240h Los resultados se presentan en el anexo C, tabla 12.

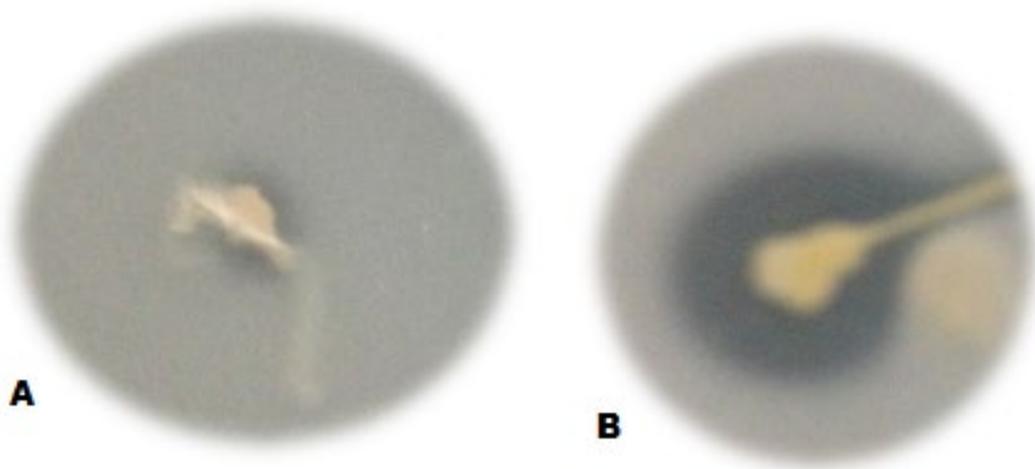


Figura 12. Halos de solubilización en placa de A) *A. nigricans*, medio Jiang con glucosa y una concentración de 5 gL^{-1} de PTC B) *A. nigricans*, medio PVK y glucosa con una concentración de 5 gL^{-1} de PTC. Después de 240h (10días) de incubación a 28°C .

7.6. Índice de solubilización sin fuente de nitrógeno en medio PVK.

De acuerdo a los reportes *Azotobacter sp* es un microorganismo de vida libre capaz de fijar nitrógeno atmosférico (Espín, 2003). Con medio PVK a una concentración 2.5gL^{-1} y 5gL^{-1} de PTC sin fuente de nitrógeno, incubando 240h. Los resultados se muestran en la tabla 6 con 2.25 y 1.85 respectivamente a las concentraciones mencionadas, en la figura 13 se observa el crecimiento del microorganismo y en el gráfico 6 la comparación de los índices de solubilización a ambas concentraciones.

Tabla 6. Índice de solubilización de PTC a una concentración de 2.5gL^{-1} y 5gL^{-1} por *A. nigricans* sin fuente de nitrógeno.

Cepa	PTC gL^{-1}	I.S (28°C)
<i>A. nigricans</i>	5	1.85
<i>A. nigricans</i>	2.5	2.25

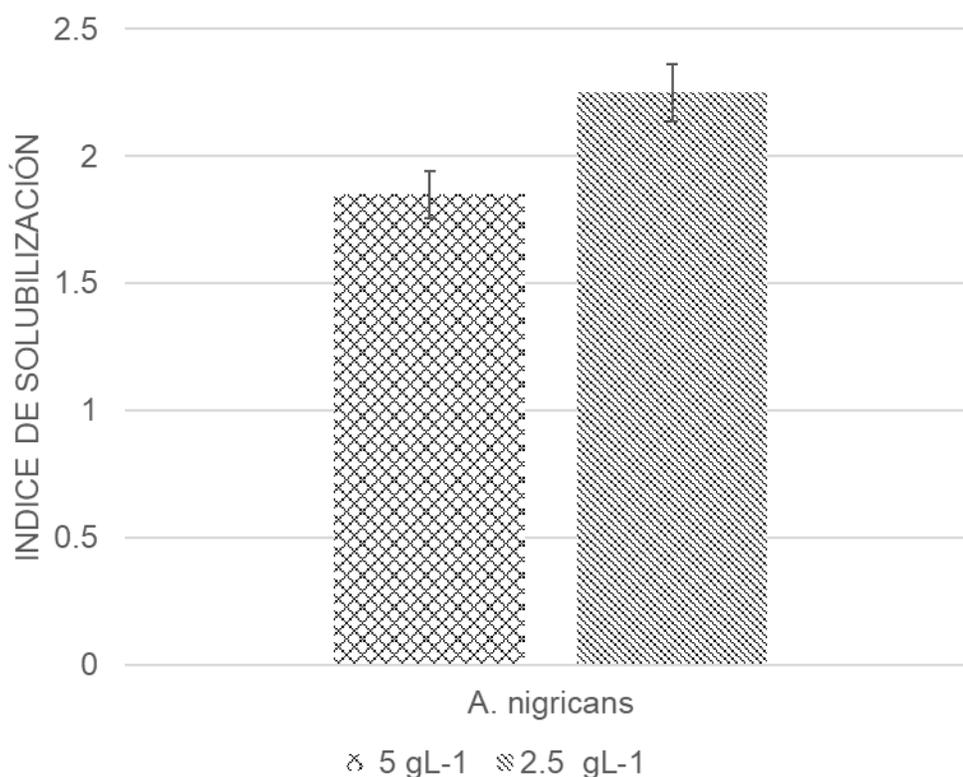


Gráfico 6. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, con glucosa y medio PVK a una concentración de 2.5gL^{-1} y 5gL^{-1} de PTC sin fuente de nitrógeno, incubándose a 28°C por 240h Los resultados se presentan en el anexo C, tabla 13.

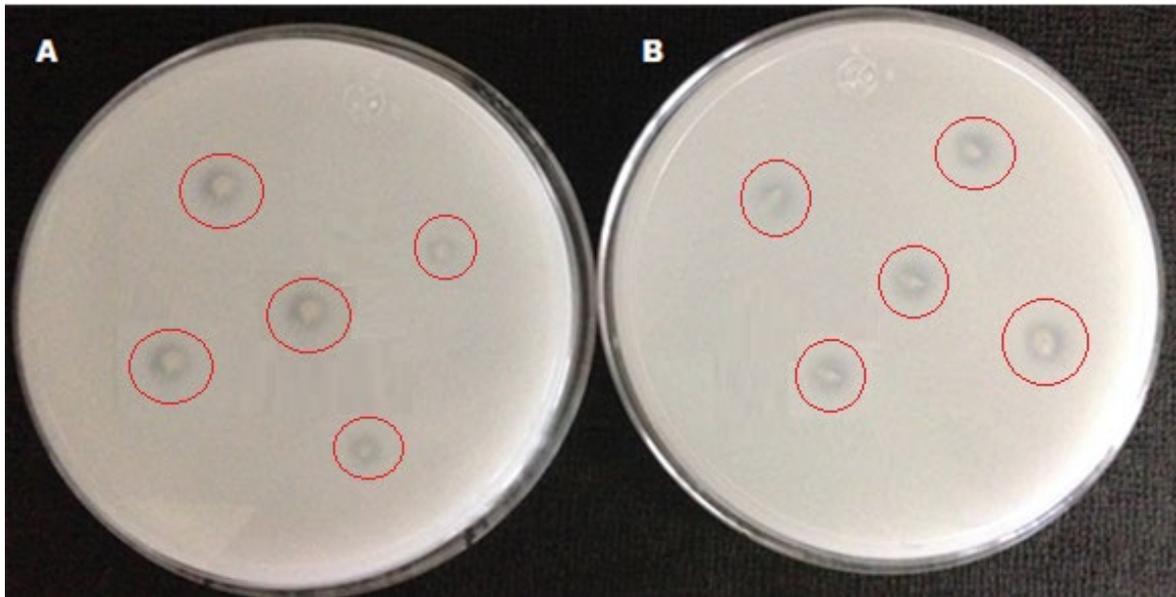


Figura 13. Halos de solubilización de A) *A. nigricans*, medio PVK sin nitrógeno y glucosa con una concentración de 5 gL^{-1} PTC B) *A. nigricans*, medio PVK sin nitrógeno y glucosa con una concentración de 2.5 gL^{-1} PTC. Después de 7 días de incubación a 28°C .

7.7. Cinética de crecimiento con dos fuentes de carbono.

Al finalizar la etapa experimental en medio sólido y comprobar que existe solubilización de PTC, se procedió a la cuantificación de la solubilización de esta fuente de fósforo. Se seleccionó el medio de Jiang (Jiang *et al.* 2003) como matriz ya que en su formulación contiene sales y una fuente de carbono para la preparación de un agua sintética.

En el primer ensayo se utilizó una concentración de 5 gL^{-1} de PTC, con dos fuentes de carbono sacarosa y glucosa, para cuantificar el fósforo soluble en el medio, por el método colorimétrico de Hach® (Water Analysis Handbook. 2013)

En el gráfico 7 se muestran los resultados de la solubilización con sacarosa utilizando esta fuente de carbono ya que *A. nigricans* la incorpora de manera inmediata a su metabolismo

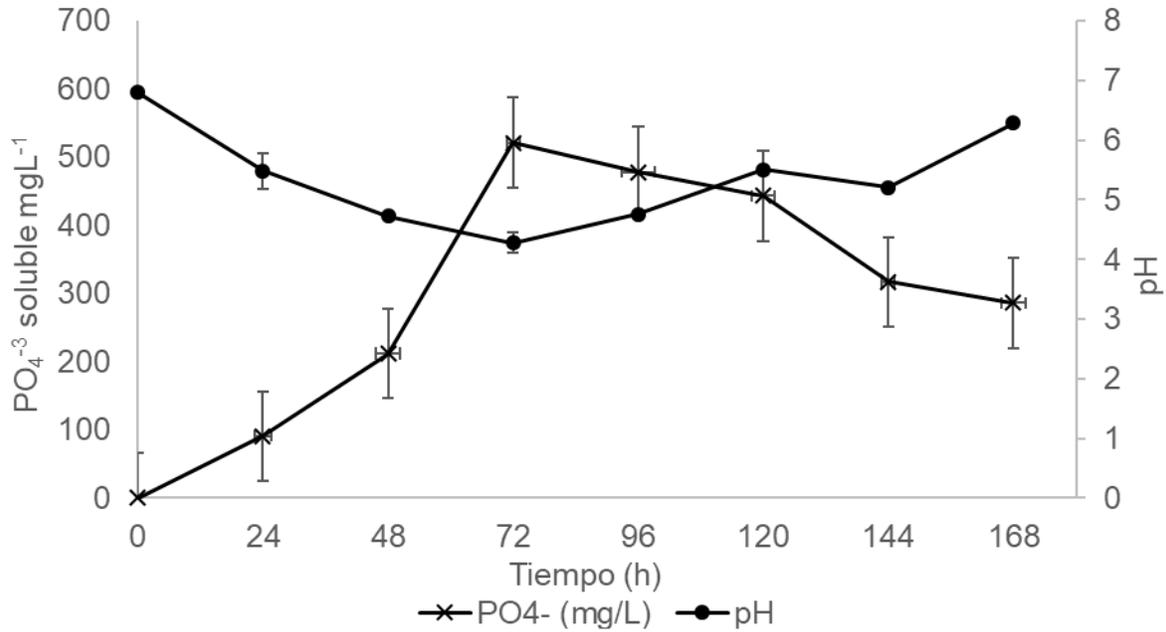


Gráfico 7. Solubilización de PTC por *A. nigricans* y variación de pH hasta las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 14.

En el gráfico 8 se muestran los resultados con glucosa como única fuente de carbono.

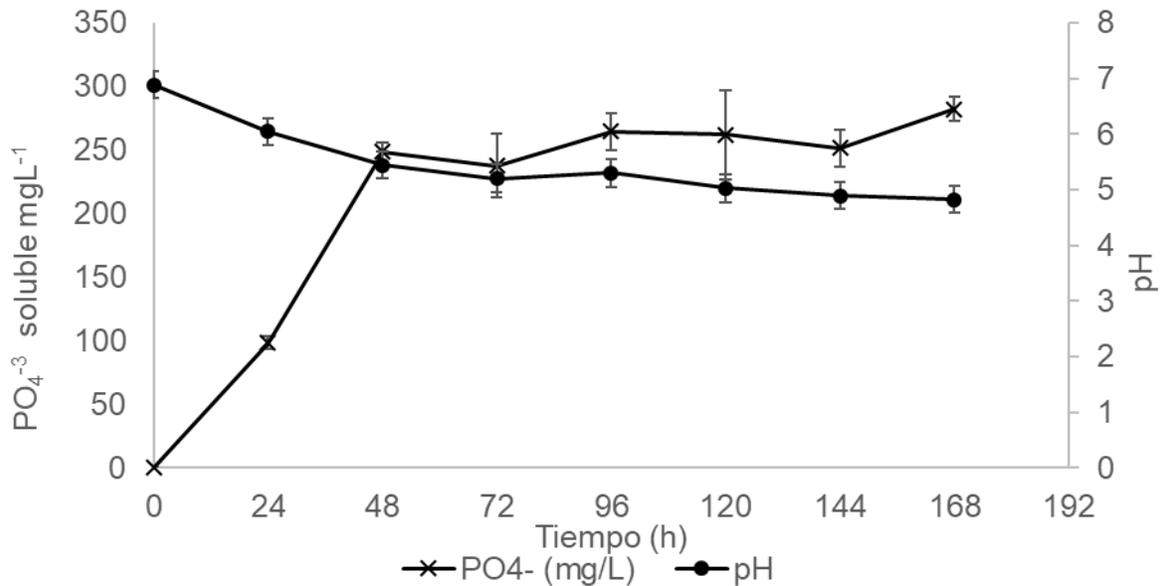


Gráfico 8. Solubilización de PTC por *A. nigricans* y variación de pH hasta las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con glucosa como única fuente de carbono en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar correspondientes se presentan en el anexo C, tabla 15.

7.8. Determinación de biomasa

Para la cuantificación de biomasa celular, se utilizaron filtros de $0.45\mu\text{m}$ para separar la biomasa, sin embargo, el fosfato remanente se filtraba simultáneamente, por lo cual interfería en el peso de la biomasa y ésta se sobrestimaba. Lo anterior se observa en el gráfico 9 las variaciones gravimétricas a las 96 y 120h se deben a las cantidades de fosfatos remanentes en el medio, presentando la misma anomalía en el gráfico 10.

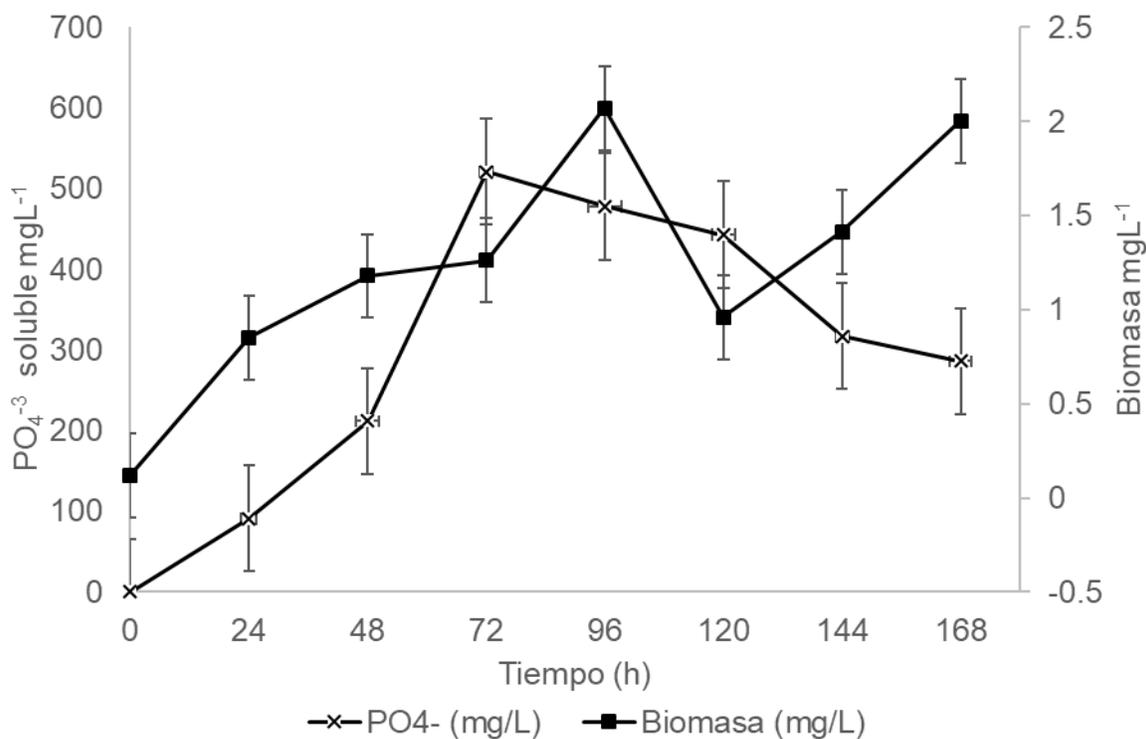


Gráfico 9. Biomasa de *A. nigricans* con sacarosa como fuente de carbono, en medio Jiang y 2.5gL^{-1} de PTC incubando a 28°C y 125rpm. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 14.

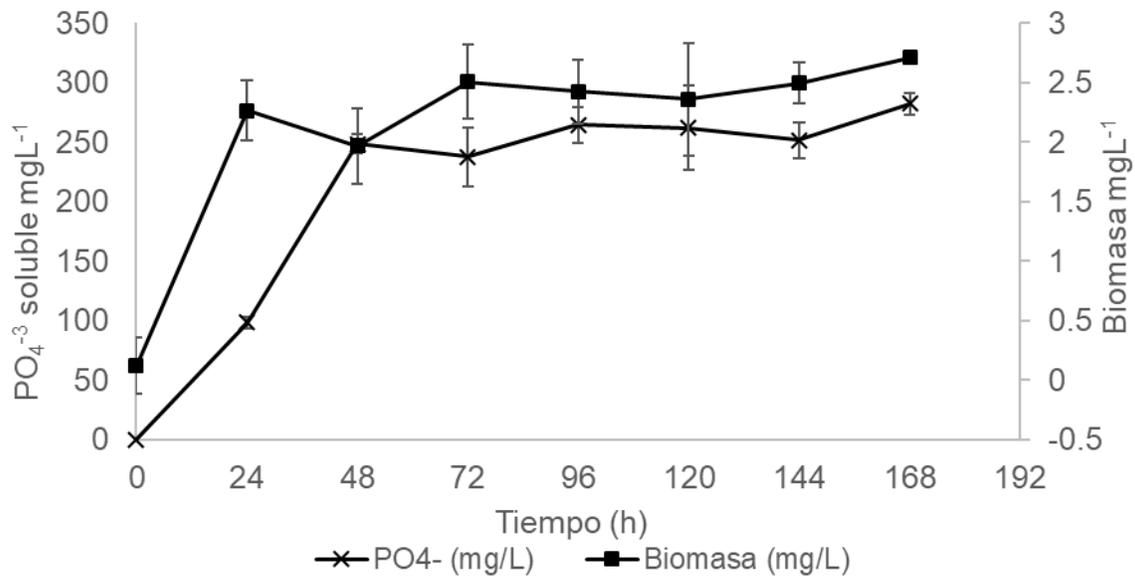


Gráfico 10. Biomasa de *A. nigricans* con glucosa como fuente de carbono y 2.5gL⁻¹ de PTC incubando a 28°C y 125rpm. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 15.

7.9. Cinética de crecimiento y solubilización de fosfato tricálcico (PTC) con sacarosa.

Al obtener un mayor rendimiento (50mgL⁻¹ de PO₄³⁻) de solubilización con sacarosa respecto a la solubilización con glucosa (39mgL⁻¹ de PO₄³⁻) como fuente de carbono se utilizó sacarosa para los siguientes experimentos y para cuantificar crecimiento se bajó la concentración de PTC a 50 mgL⁻¹ y se realizó cuenta de células por la cámara de Neubauer; en el gráfico 11 se muestran los resultados de la solubilización de fosfato en 168h y en el gráfico 12 se muestran los resultados de biomasa contra cuenta de células.

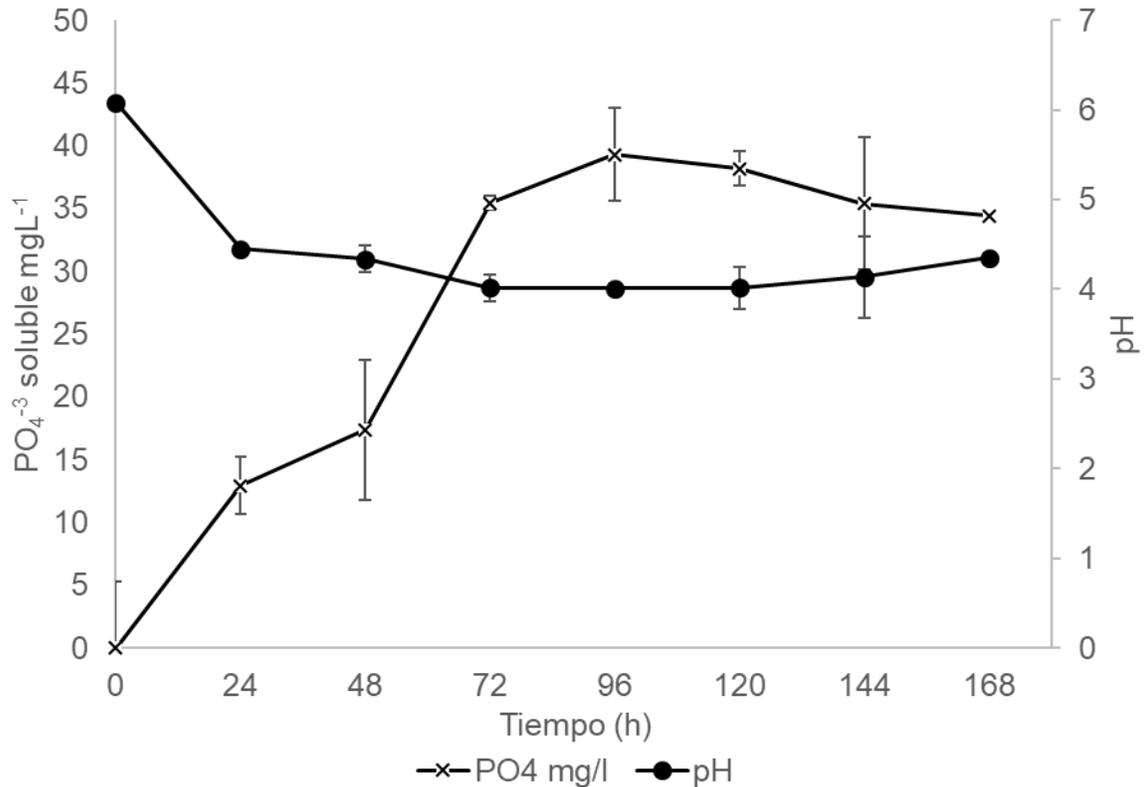


Gráfico 11. Solubilización de PTC a una concentración de 50mgL⁻¹ por *A. nigricans* y variación de pH hasta las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono, en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 16.

La cuenta de células se realizó en cámara de Neubauer calculando con la siguiente fórmula:

$$\frac{\#celulas}{2} * 50,000 * Dilución = Celulas ml^{-1}$$

ec. 2

Los resultados se muestran en el gráfico 12 donde se observa un crecimiento exponencial a las primeras horas, en cuanto a biomasa en peso seco las posibles interferencias con el fosfato remanente se observan a las 24h.

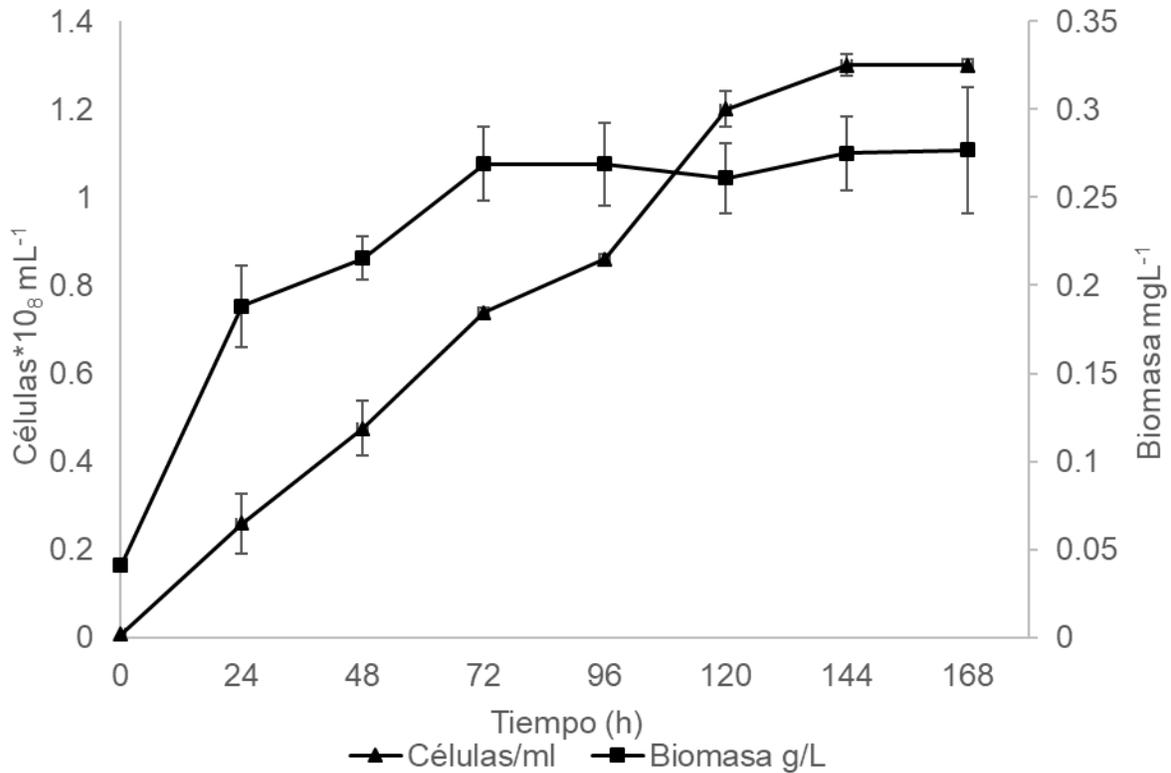


Gráfico 12. Comparación de métodos para crecimiento celular de *A. nigricans* en PTC a una concentración de 50mgL⁻¹ a las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono, en medio Jiang. Las cifras obtenidas y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 16.

7.10. Modificación de medio Jiang con verde de bromocresol

Al igual que en el medio sólido PVK se puede observar el viraje de pH en el medio, se utilizó una concentración de 0.01gL⁻¹ de verde de bromocresol para observar el cambio de pH a una concentración de PTC de 1gL⁻¹. En las figuras 14 y 15 se observan los virajes de color desde azul rey a verde claro del tiempo 0 a 96h, correspondientes a pH de 6.3 y 4.2 respectivamente.



Figura 14. Medio Jiang con verde de bromocresol 0.001hL^{-1} a las 0h

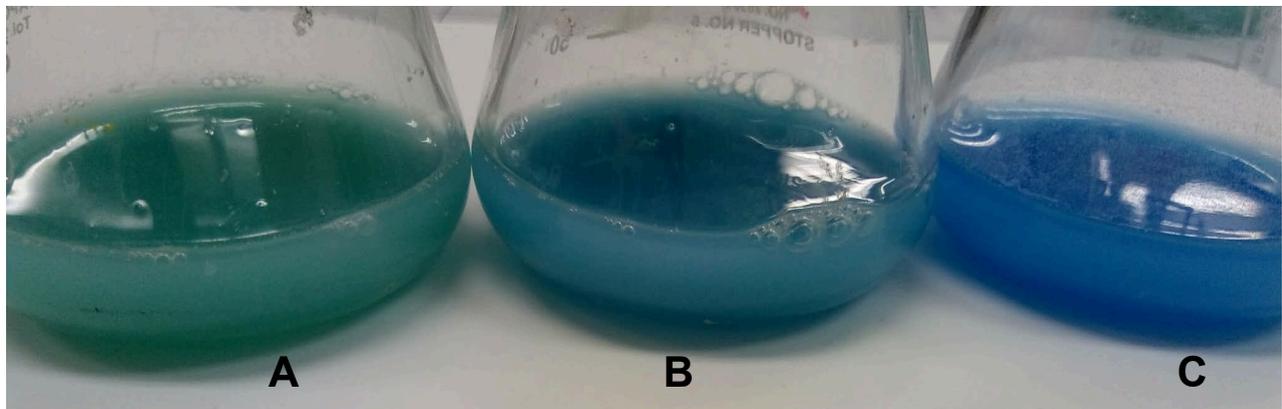


Figura 15. Medio cromógeno con indicador de pH (verde de bromocresol 0.01gL^{-1}) en la cinética a las A) 96h B) 48h y C) 0h, con *Azotobacter nigricans*, observando el viraje del pH con el color con los siguientes valores de pH; A) 4.2, B) 4.6 y C) 6.3.

En el gráfico 13 se muestran los datos de fosfato soluble contra pH donde la mayor cantidad soluble es a las 96h con un pH de 4.2., en el gráfico 14 la comparación de la cuantificación de métodos de crecimiento celular, comprobando la interferencia del fosfato remanente en biomasa por peso seco.

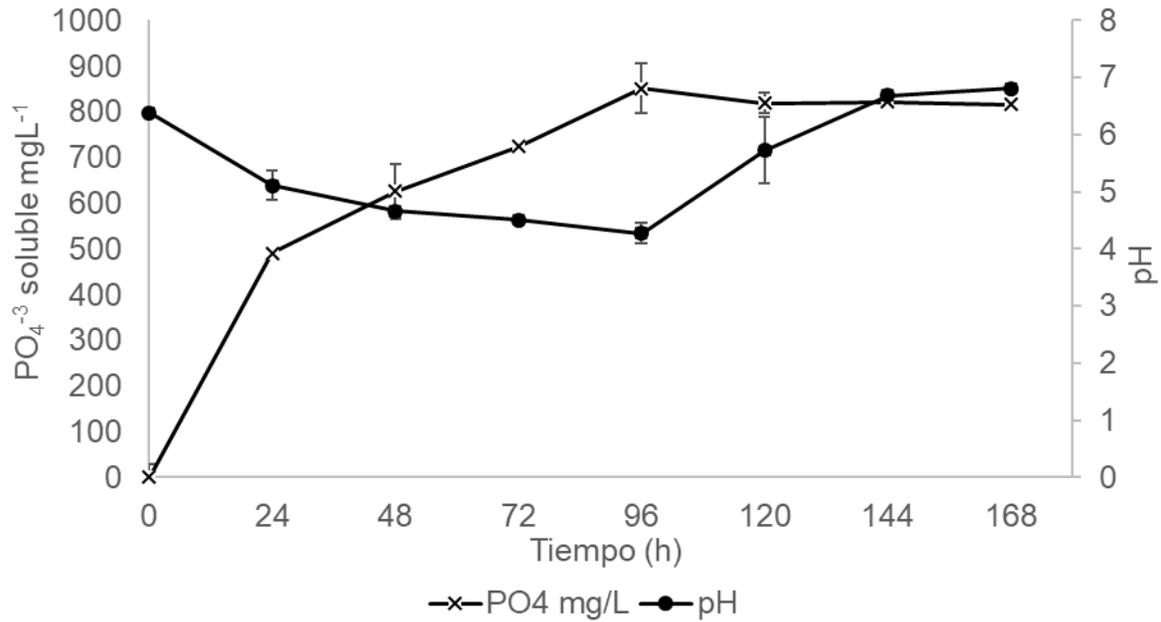


Gráfico 13. Solubilización de PTC a una concentración de 1g/L^{-1} por *A. nigricans* y pH a las 168h de incubación a 28°C , 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono en medio Jiang. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 17.

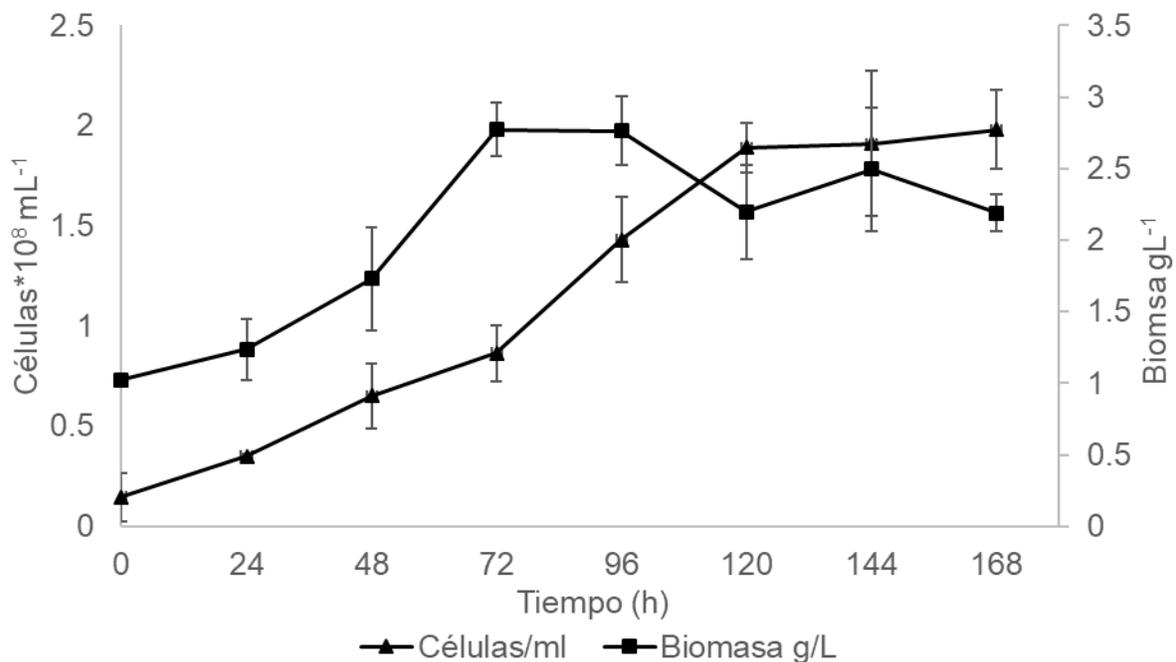


Gráfico 14. Comparación de métodos para crecimiento celular de *A. nigricans* en PTC a una concentración de 50mg/L^{-1} a las 168h de incubación a 28°C , 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono, en medio Jiang. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 17.

7.11. Tinción de Gram

Al cultivo de *A. nigricans* en medio Jiang, se le realizó la tinción de Gram cada 24h. Destacando las 24h, 96h y 168h.

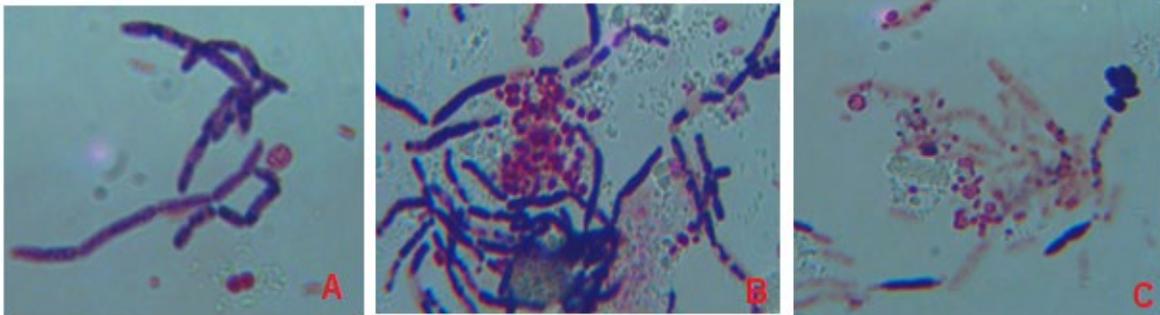


Figura 16. Tinción de Gram de *A. nigricans* del cultivo en medio Jiang con verde de bromocresol: A) 24h, B) 96h, C) 168h observados a 100x.

7.12. Cinética de crecimiento con y sin fuente de nitrógeno en medio Jiang

Al igual que en medio sólido los ensayos sin fuente de nitrógeno se realizaron para cuantificar el nitrógeno total que es fijado durante la solubilización de PTC 1gL^{-1} . En el Grafico 15 se muestran los resultados de la solubilización por *A. nigricans* a las 168h de su incubación.

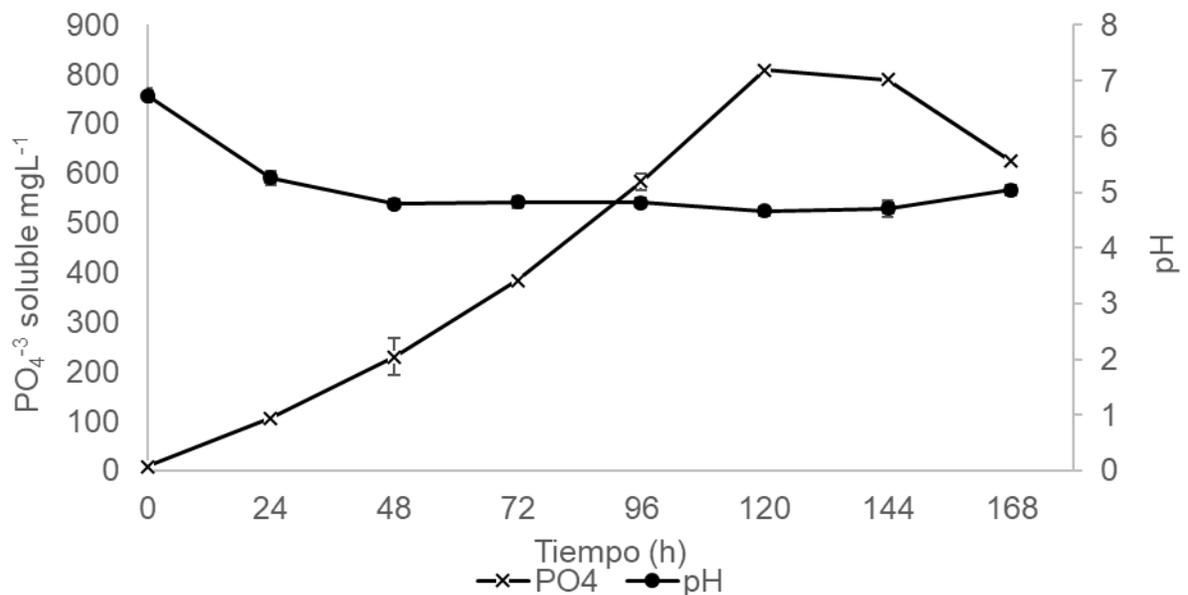


Gráfico 15. Fosfato soluble por *A. nigricans* con una concentración de 1gL^{-1} de PTC con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, incubado a 28°C , 125rpm y con sacarosa como fuente de carbono, en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 18.

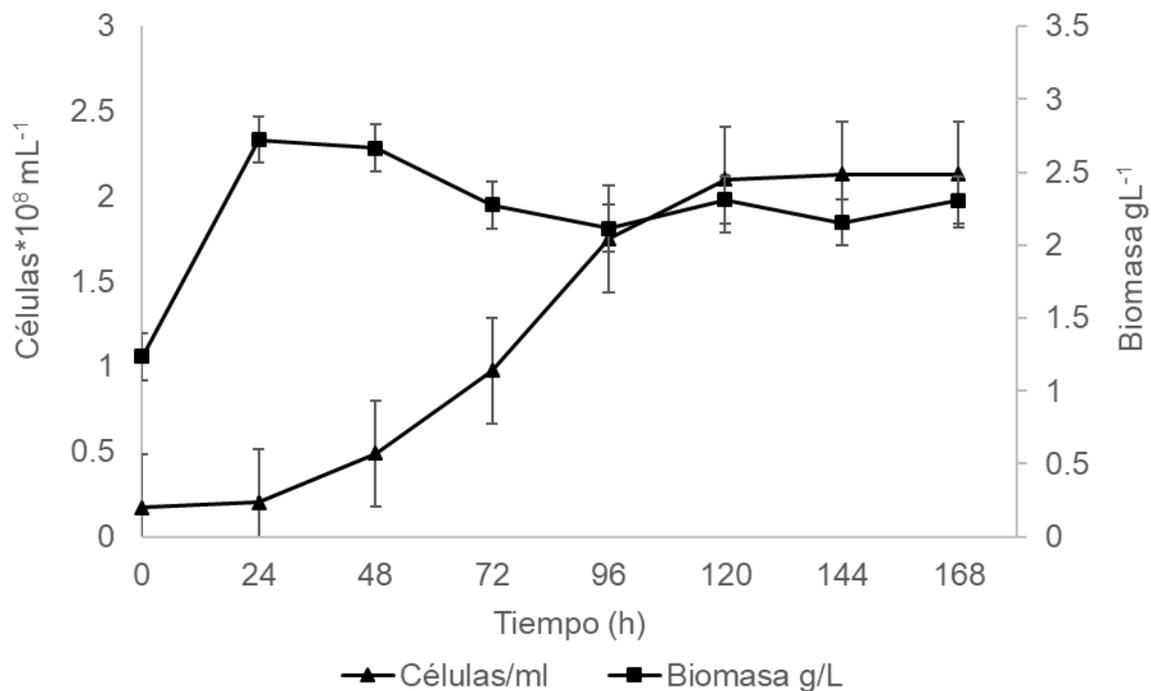


Gráfico 16. Comparación del crecimiento celular para *A nigricans* en PTC a una concentración de 1g/L^{-1} con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno a las 168h de incubación a 28°C , 125rpm y con sacarosa, en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 18.

Los resultados de los experimentos sin fuente de nitrógeno se presentan en el gráfico 17 con cantidad de fosfato soluble y crecimiento del microorganismo en el gráfico 18.

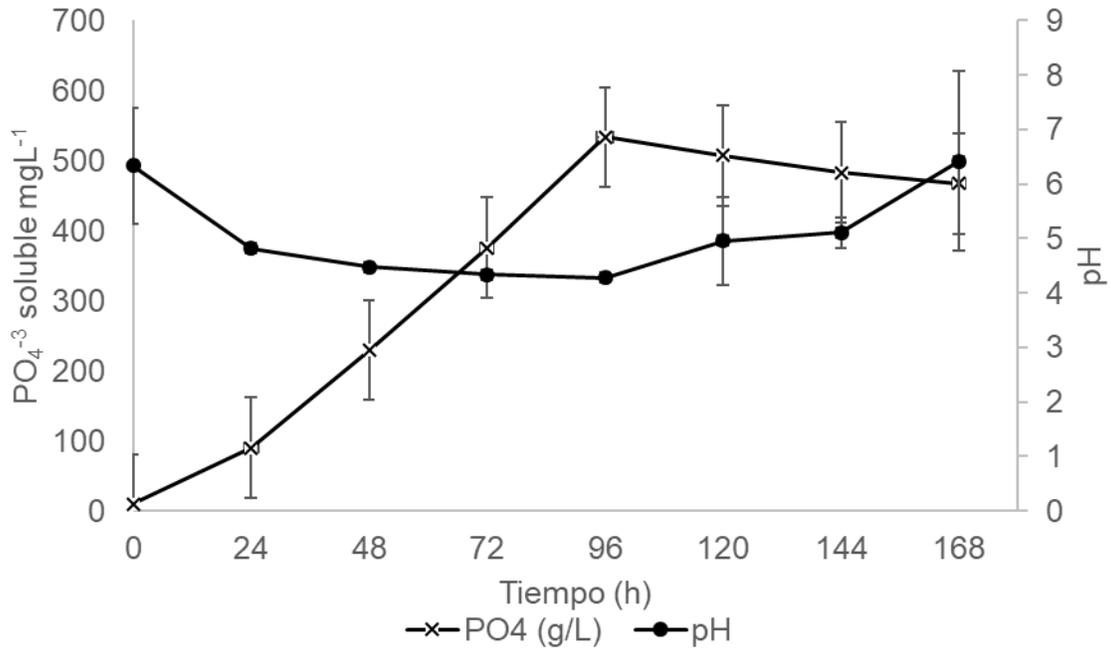


Gráfico 17. Fosfato soluble por *A. nigricans* con una concentración de 1gL⁻¹ de PTC sin fuente de nitrógeno, incubado a 28°C, 125rpm y con sacarosa como fuente de carbono, en medio Jiang. Sin nitrógeno Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, Tabla 19.

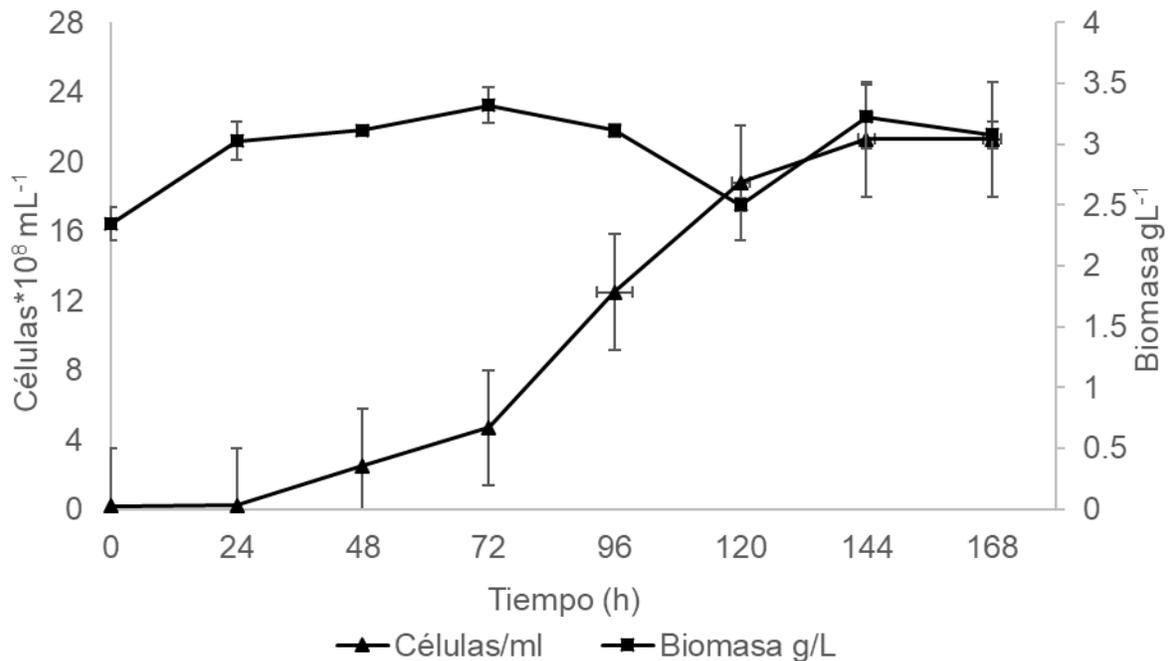


Gráfico 18. Crecimiento celular de *A. nigricans* con una concentración de 1gL⁻¹ de PTC sin fuente de nitrógeno, incubando a 28°C, 125rpm y con sacarosa como fuente de carbono, en medio Jiang. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 19.

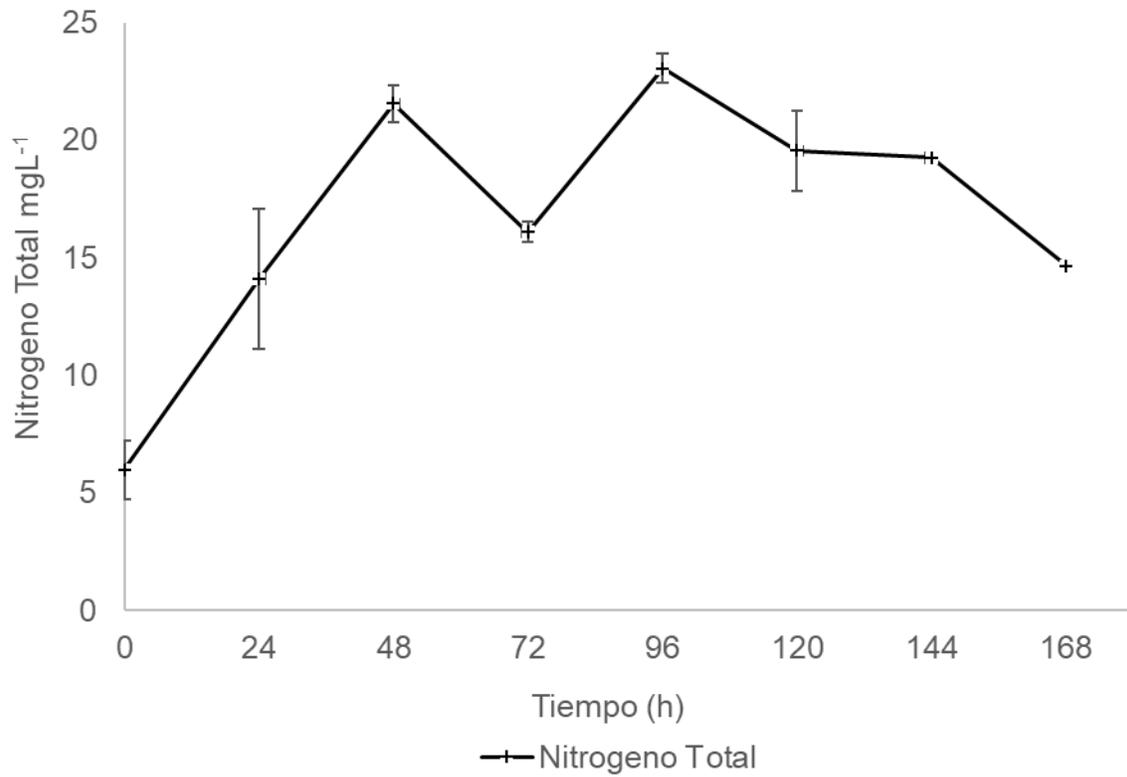


Gráfico 19. Nitrógeno total en el medio Jiang, cuantificado por medio del *kit* colorimétrico Hach®, por *A. nigricans*, incubado a 28°C y 125rpm y sacarosa como fuente de carbono. Los resultados y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 19.

7.13. Cromatografía en capa fina de sílica gel para la detección de ácidos orgánicos sintetizados.

En la figura 17 se muestra la cromatografía en capa fina de los ácidos orgánicos producidos por *A. nigrkans* en un medio con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno el eluyente usado fue isopropanol - amonio – agua (70:20:10) posteriormente revelándose con luz ultravioleta (250nm) (Baziramakenga *et al.*, 1995).

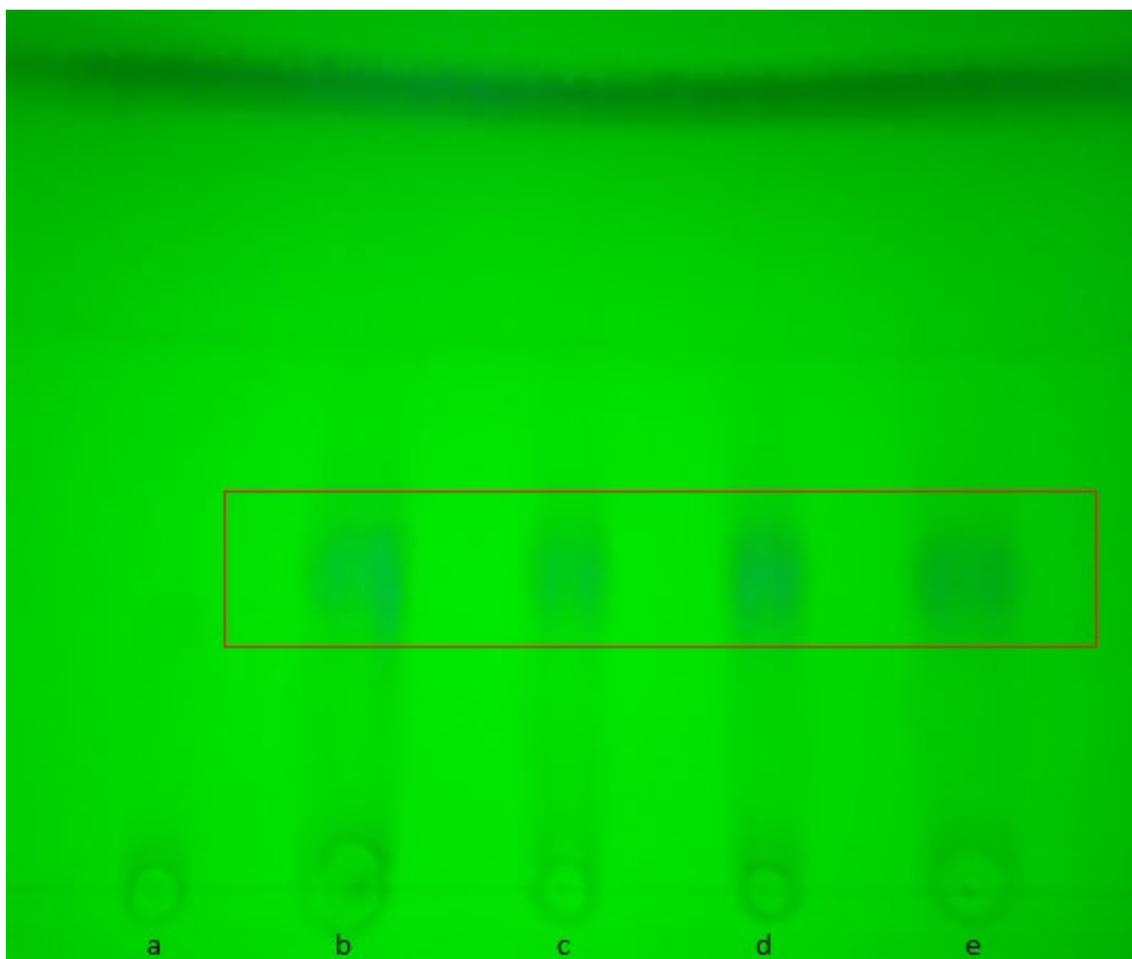


Figura 17. Cromatografía en capa fina de sílica del (TLC) de ácidos orgánicos sintetizados por *A. nigrkans* con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en medio Jiang con sacarosa como fuente de carbono incubados a 28°C con 125rpm y revelados a una longitud de onda de 250nm correspondientes: a) blanco, b) 24h, c) 72h, d) 120h y e) 168h.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}}$$

ec. 3

Se calculó su $R_f = 0.37$, correspondiente a Ácido málico, según lo reportados por, Bajpai y Rao, (1971).

En la figura 18 se muestra la cromatografía en capa fina de los ácidos orgánicos producidos por *A. nigricans* en un medio Jiang libre de nitrógeno. En el cual su R_f también corresponde a 0.37, solo que este solo se observó a las 72 y 168h.

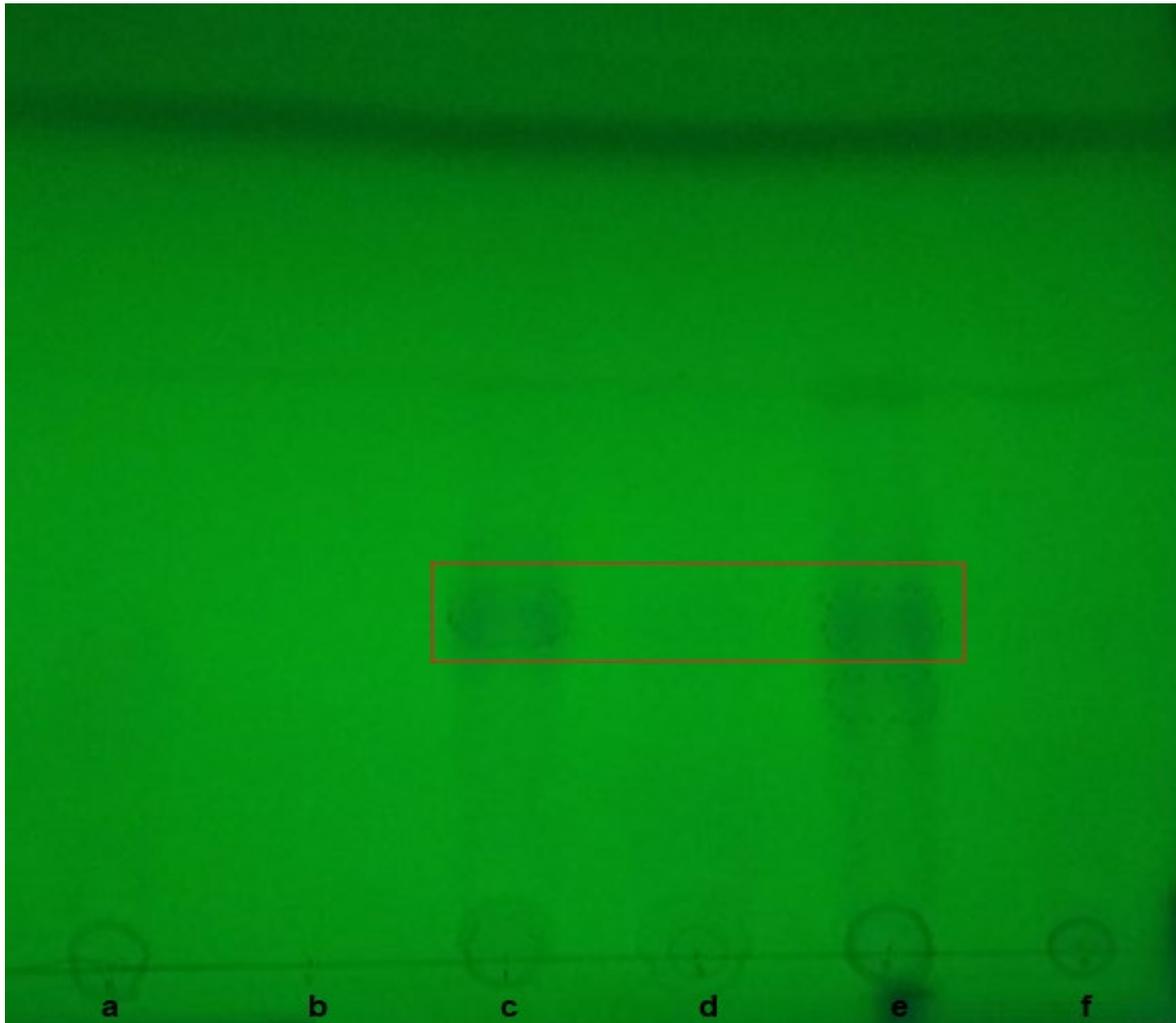


Figura 18. Cromatografía en capa fina de sílica gel (TLC) de ácidos orgánicos sintetizados con *A. nigricans* sin fuente de nitrógeno, en medio Jiang con sacarosa como fuente de carbono incubado a 28°C con 125rpm y revelados a una longitud de onda de 250nm, correspondiente: a) blanco, b) 24h, c) 72h, d) 120h, e) 168h, f) Testigo, sin nitrógeno.

7.14. Pruebas para solubilización de fosfato con PDA.

El PDA en concentración de 5gL^{-1} utilizado como fuente de fosfato y nitrógeno, la fuente de carbono se utilizó sacarosa en 5gL^{-1} , para la cinética no se utilizó un medio formulado, solamente PDA y fuente de carbono. En el gráfico 20 se muestran los resultados para la cinética de fosfato soluble y pH. Debido a que el PDA es parcialmente soluble en agua inicialmente tiene una concentración de fosfato de 2.35gL^{-1} y de nitrógeno 11mgL^{-1} por lo que no se añadió ninguna otra fuente de nitrógeno. En el gráfico 21 se muestra el crecimiento de *A. nigricans* y en el gráfico 22 las cantidades de nitrógeno total que fue fijada por el microorganismo.

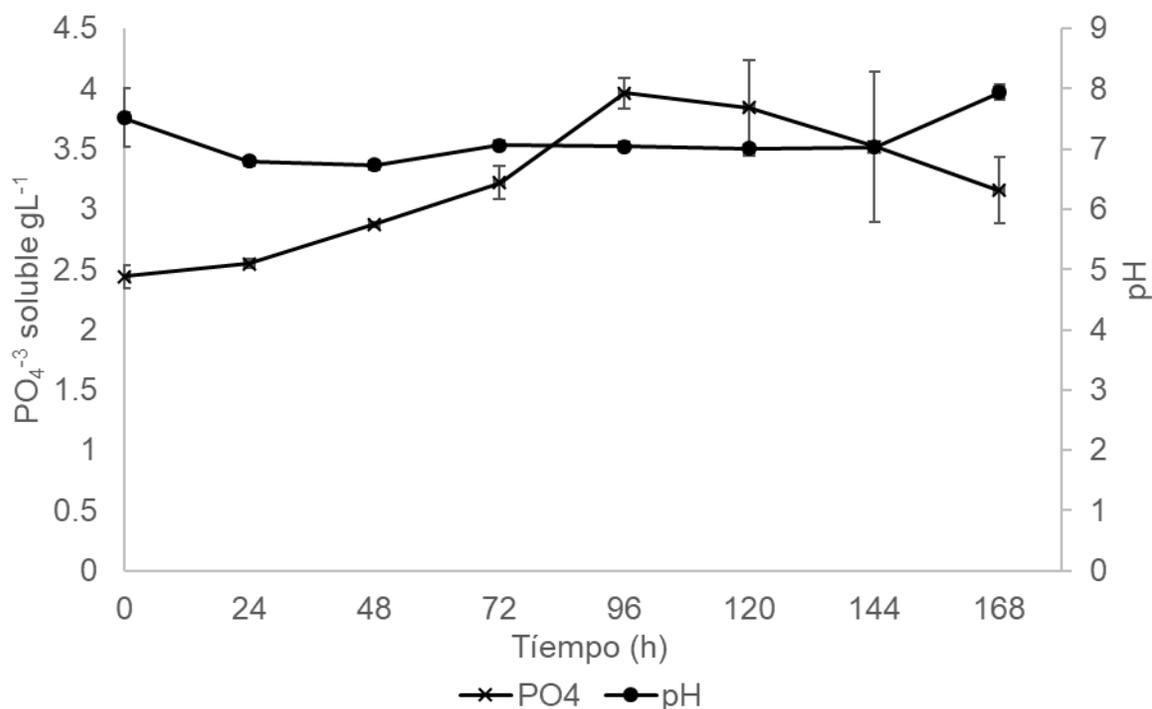


Gráfico 20. Fosfato soluble por *A. nigricans* con una concentración de 5gL^{-1} de PDA y 5gL^{-1} de sacarosa. Incubado a 28°C , 125rpm. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 20.

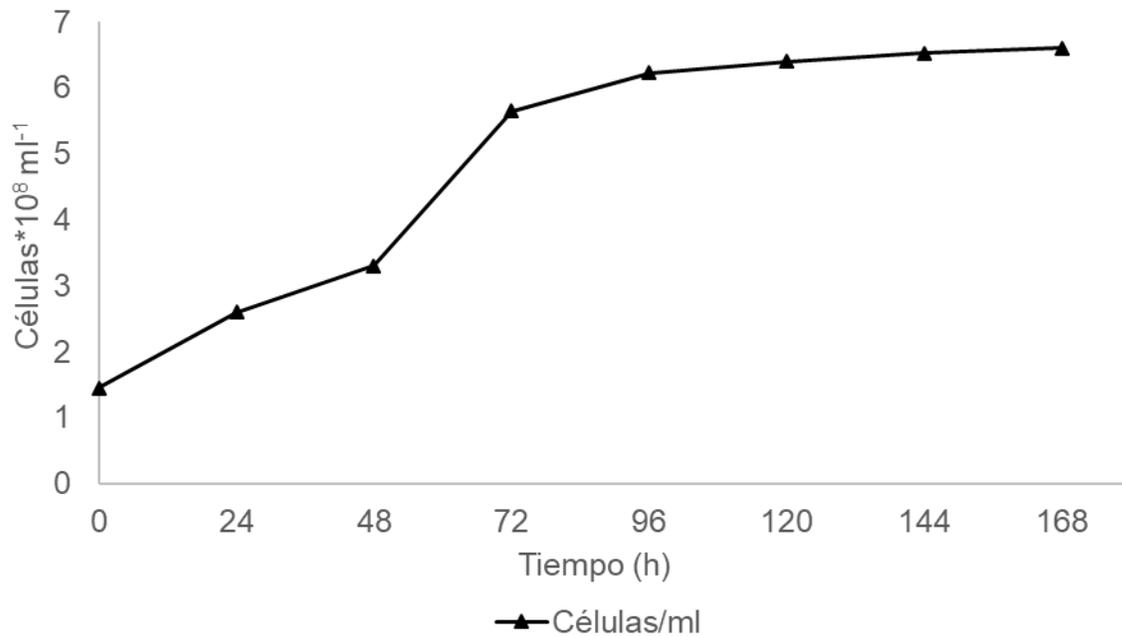


Gráfico 21. Crecimiento celular de *A. nigrkans* con una concentración de 5gL⁻¹ de PDA, con sacarosa como fuente de carbono, incubando a 28°C, 125rpm. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 20.

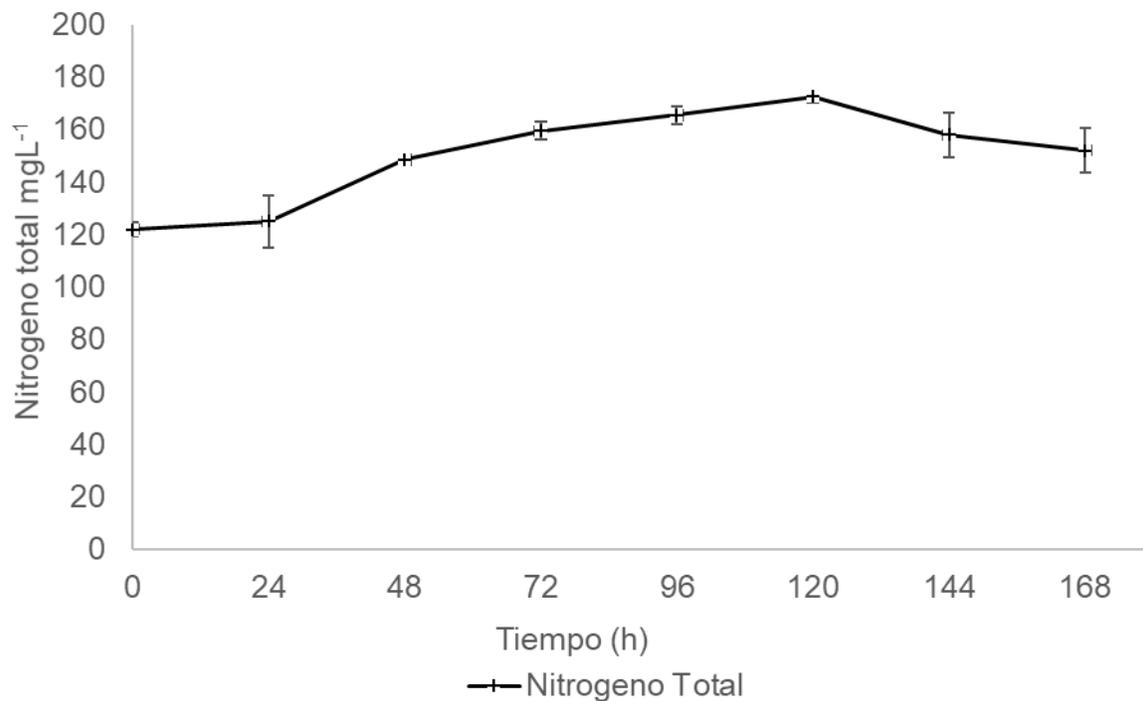


Gráfico 22. Nitrógeno total en el medio con PDA y sacarosa como fuente de carbono, cuantificado por medio del *kit* colorimétrico Hach®. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 20.



Figura 19. Cromatografía en capa fina de sílica gel (TLC) de ácidos orgánicos sintetizados por *A. nigrkans* con PDA como fuente de nitrógeno y fosfato, incubado a 28°C y 125rpm. Los carriles corresponden a: a) Blanco, b) 24h, c) 72h, d) 120h, e) 168h, f) Testigo.

El Rf calculado para la mancha superior es de: 0.37 correspondiente al ácido málico (Bajpai y Rao, 1971); mientras que para la mancha inferior es: 0.21 su Rf reportado como ácido succínico.

En la figura 20, las tinciones de Gram muestran los quistes y bacilos característicos de *A. nigrkans* durante la cinética con PDA desde las 24 a las 168h, observando que a las 168h se encuentra totalmente enquistado ya que los nutrientes necesarios disminuyen.

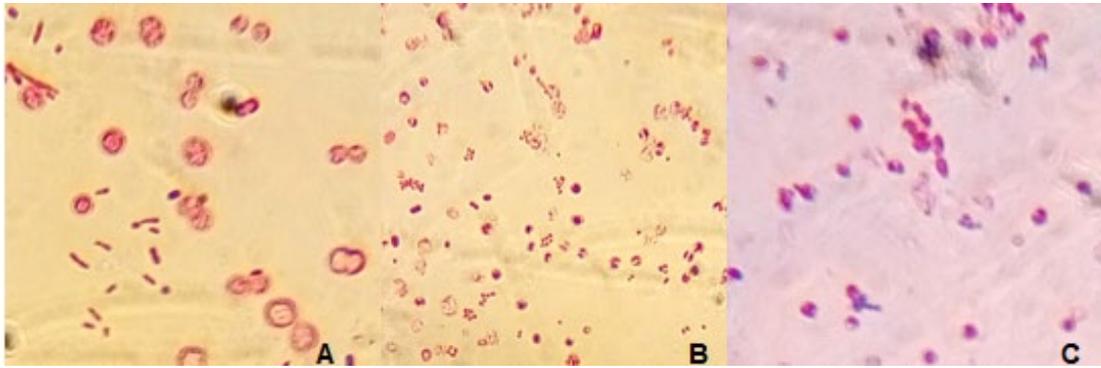


Figura 20. Tinción de Gram de *A. nigricans* del cultivo en PDA incubado a 28°C y 125rpm a: A) 24h, B) 96h, C) 168 h a un aumento de 100x.

7.15. Pruebas para solubilización de fosfato con lodos residuales.

El lodo residual correspondiente a una planta de tratamiento de aguas residuales domesticas e industriales, obteniendo la muestra de lodos del sedimentador secundario que contiene un DQO de 1071 mgL⁻¹, fosfato total de 10.47mgL⁻¹.

Los lodos se esterilizaron a 121°C por 30min antes de usarse, se enriquecieron los lodos agregando una concentración conocida de PTC 2.5gL⁻¹ y sacarosa (5gL⁻¹) como fuente de carbono. El gráfico 23 muestra la solubilización de fosfato en lodos residuales y el pH del medio.

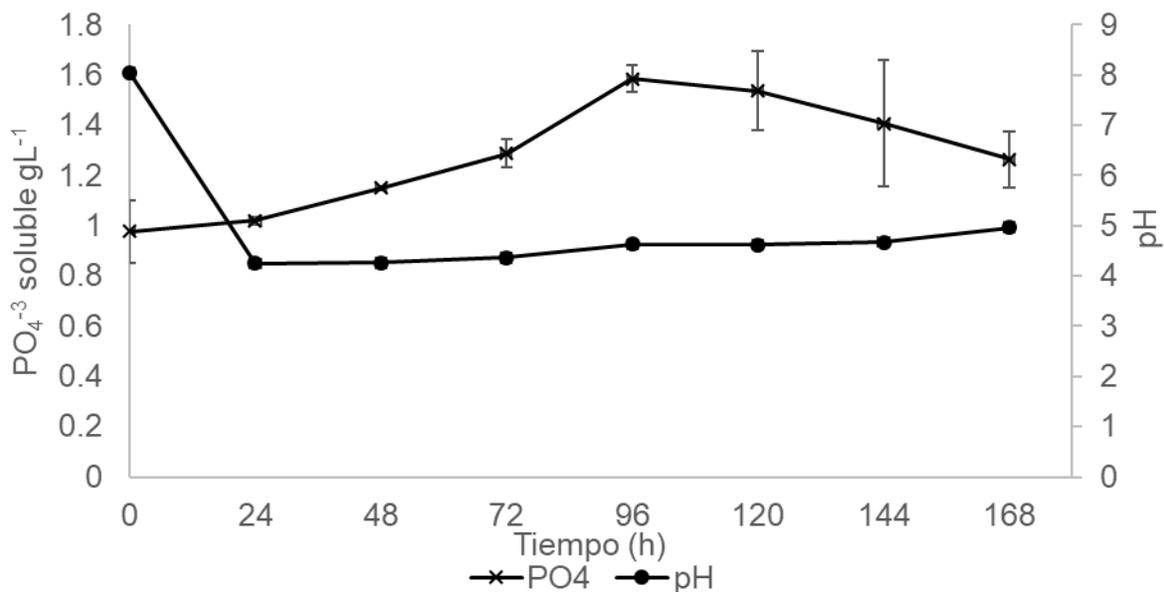


Gráfico 23. Fosfato soluble por *A. nigricans* con 25 ml de lodos residuales y una concentración de 5gL⁻¹ de PTC, incubado a 28°C, 125rpm con sacarosa como fuente de carbono. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 21.

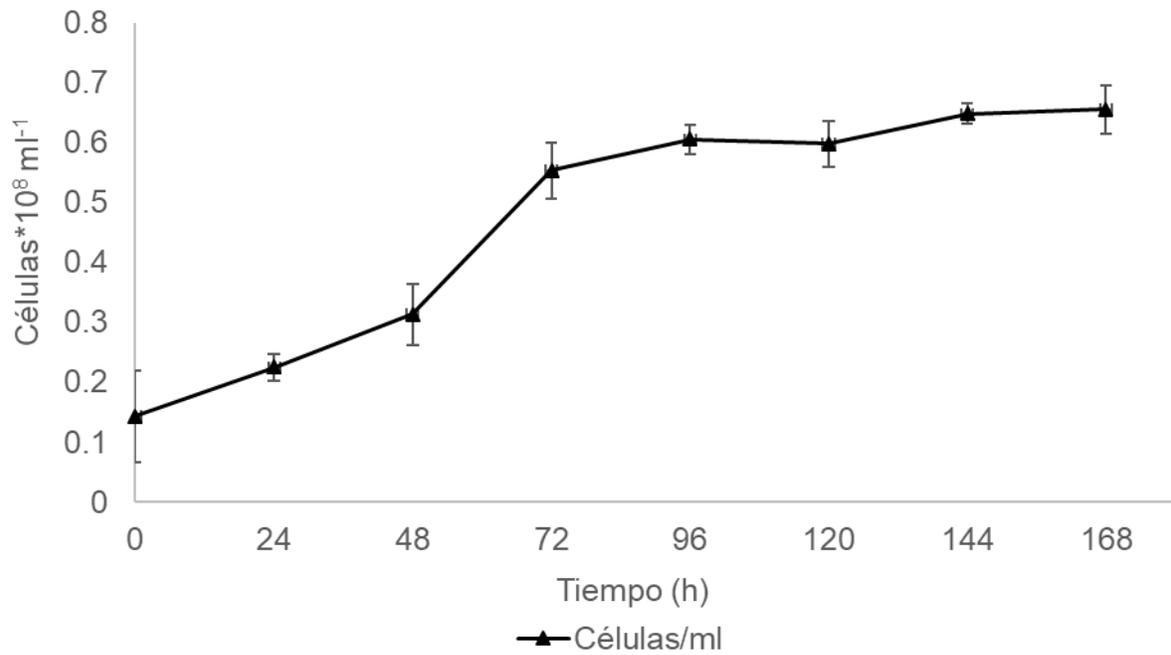


Gráfico 24. Crecimiento celular en medio con lodos residuales de la cepa *A. nigrkans* con una concentración de 5gL⁻¹ PTC sin fuente de nitrógeno, incubando a 28°C, 125rpm y con sacarosa como fuente de carbono. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 21.

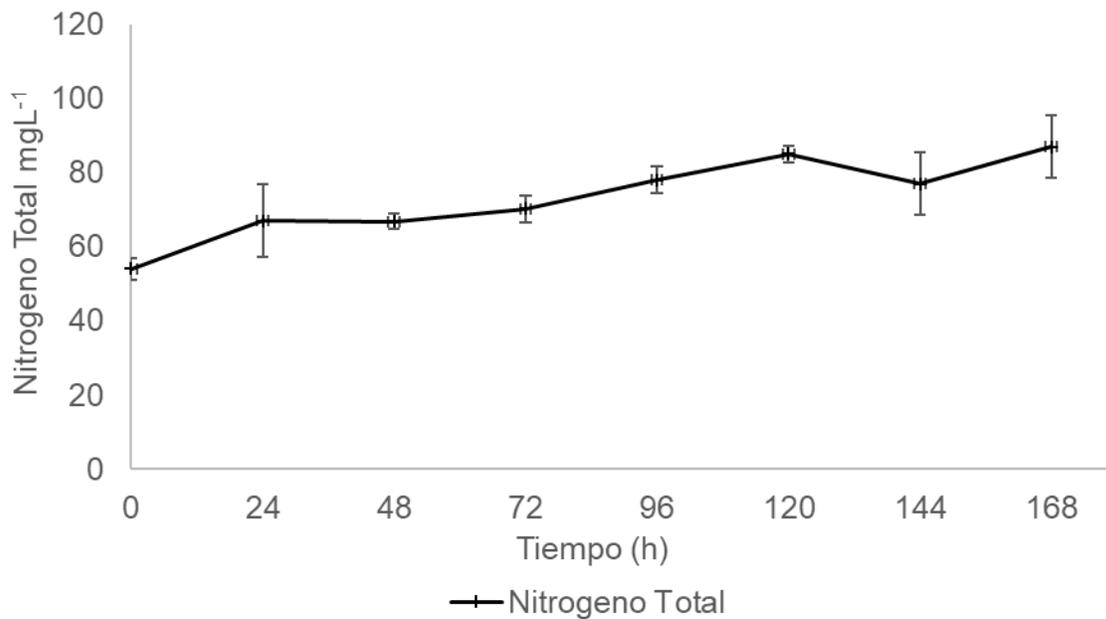


Gráfico 25. Nitrógeno total en el medio con los lodos residuales con la concentración de 50mgL^{-1} de nitrógeno inicial incubado a 28°C y 125rpm , cuantificado por medio del *kit* colorimétrico Hach®. Los datos y las desviaciones estándar se presentan en el anexo C, tabla 21.

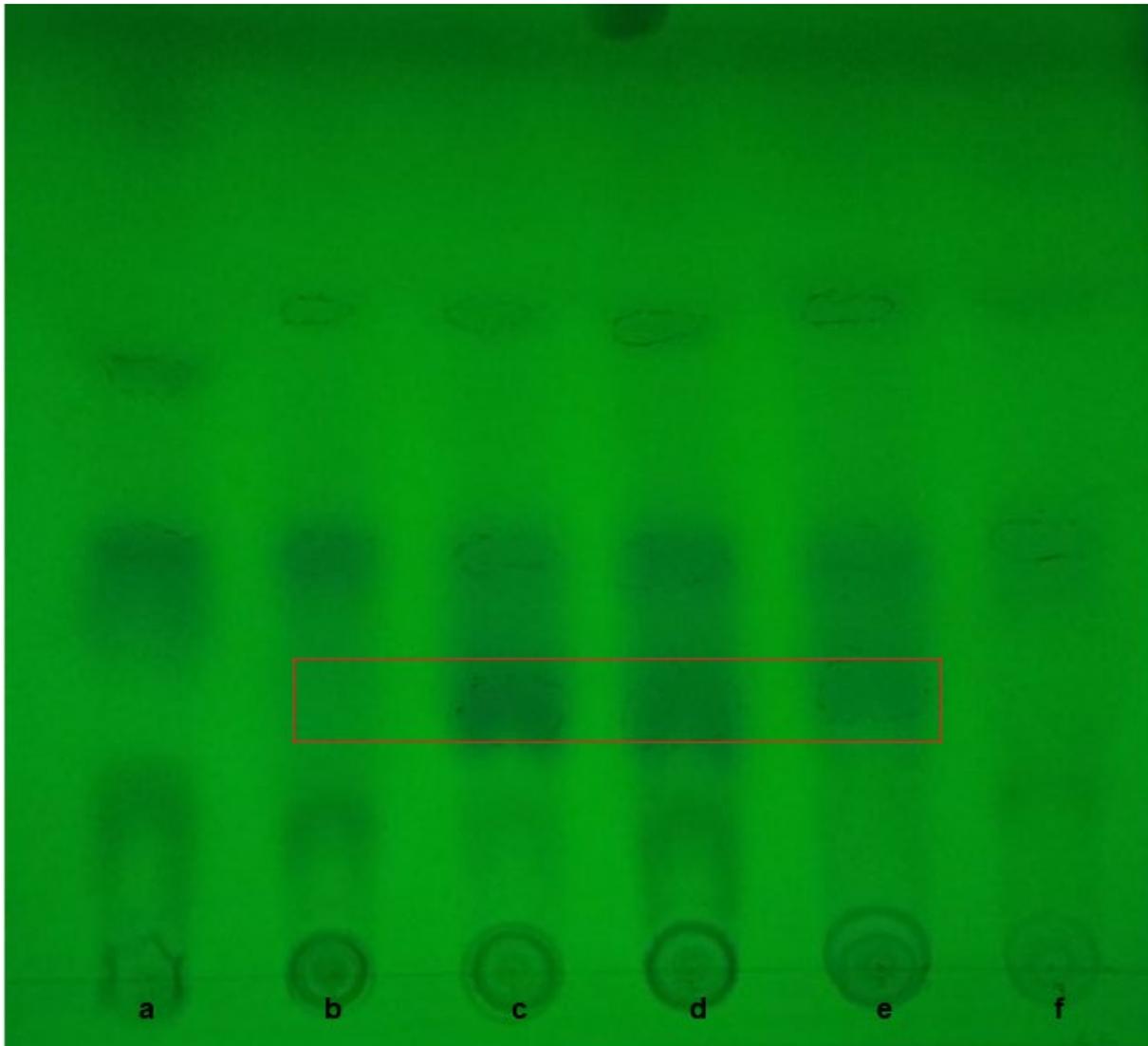


Figura 21. Cromatografía en capa fina de sílica gel (TLC) de ácidos orgánicos sintetizados por *A. nigricans* con lodos residuales incubado a 28°C y 125rpm . Los carriles corresponden a: a) Blanco, b) 24h, c) 72h, d) 120h, e) 168h, f) Testigo.

En la figura 21 el R_f calculado para las machas resaltadas en el recuadro rojo corresponden a 0.37 correspondiente al reportado como ácido málico, otro de sus R_f calculados de 0.24 corresponde a ácido succínico reportado (Bajpai y Rao 1971). Las tinciones de Gram en la figura 22 se muestran las células muertas (por

esterilización 121°C por 30min, que se encuentran en los lodos residuales así como *A. nigricans*, en la cinética con lodos residuales.

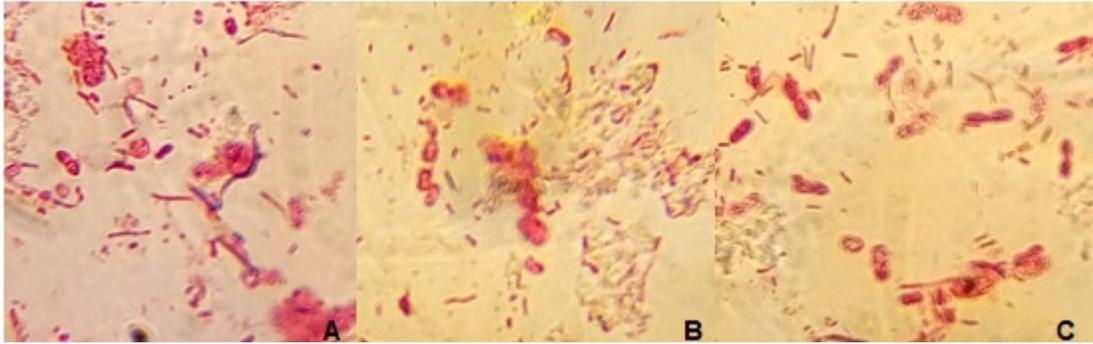


Figura 22. Tinción de Gram de *A. nigricans* del cultivo de lodos residuales a: A) 24h, B) 96h, C) 168h a un aumento de 100x.

8. DISCUSIÓN

Se ha comprobado que *A nigricans* es un microorganismo que degrada queroseno en un 50% (García E. *et al.*, 2009). Es un microorganismo que crece en fuentes de carbono no convencionales como ácidos orgánicos, carbohidratos y alcoholes (Garg S.K. *et al.*, 1988), el crecimiento de este microorganismo en sacarosa se presenta en el gráfico 1 obteniendo 4100mgL^{-1} de biomasa.

Para el primer ensayo que corresponde a la comprobación de que *A nigricans* puede solubilizar fosfato tricálcico (PTC) se utilizó medio PVK en medio solido de esta manera observar cualitativamente su capacidad de solubilización, mediante la medición del diámetro de la colonia y del halo de solubilización. Para una concentración de 2.5gL^{-1} (PTC) con dos fuentes de carbono, sacarosa y manitol, se obtuvo un índice de solubilización (IS) de 1.48 y 1 a 28°C ; 1.22 y 1 a 30°C (Tabla 2) respectivamente, se utilizó también un control positivo el cual está comprobado que solubiliza PTC que es la cepa de *Azotobacter chroococcum* obteniendo un IS de 1 y 1.33 a 28°C (Tabla 2), estos resultados por comparación se descarta el efecto de la temperatura ya que no es significativo además de que la fuente de carbono en forma de manitol no es preferible para el metabolismo de *A. nigricans* que prefiere la temperatura de 28°C y sacarosa.

Para llevar a cabo la solubilización de PTC uno de los factores principales es el cambio de pH en el medio por medio de la producción de ácidos orgánicos (Mardad *et al.*, 2013, Illmer y Shinner, 1995). Para observar la producción de estos ácidos orgánicos en el medio se utilizó verde de bromocresol (0.001gL^{-1}) en PVK.

Nautiyal (1999) reportó que la fuente de carbono tiene un papel importante en el mecanismo de solubilización se ve afectado de manera positiva o negativa dependiendo de la naturaleza del compuesto. Para visualizar el halo en el caso de *A. nigricans* el mejor resultado fue con glucosa ya que se alcanzó un índice de solubilización de 2.45 a una concentración de PTC 2.5gL^{-1} y 2.1 a una concentración de 5gL^{-1} PTC (Tabla 4,5); en el caso de *A. chroococcum* se obtuvo 1.9 con 2.5gL^{-1} de PTC (Tabla 4), debido a que la glucosa es una fuente de

carbono sencilla y se asimila de forma más rápida en el metabolismo de ambos microorganismos; esto comparado con los IS de 1.1 y 1.4 con sacarosa y manitol.

De igual manera se realizó un ensayo sin fuente de nitrógeno y corroborar la capacidad de solubilización, obteniendo un IS de 2.25 a 2.5gL⁻¹ de PTC (Tabla 6). Los IS con una concentración de PTC a 5gL⁻¹ son menores posiblemente a que *A. nigricans* ya que al no tener los nutrientes totalmente disponibles es más tardado obtener una solubilización del fosfato tricálcico.

Debido al alto IS se utilizara sacarosa y glucosa para el siguiente ensayo en medio líquido y así cuantificar el fosfato soluble en el medio.

Para obtener una comparación en cuanto a la fuente de carbono se realizaron dos cinéticas en medio líquido Jiang con una concentración de 5gL⁻¹ de PTC, la primera con sacarosa obteniendo 521mgL⁻¹ de PO₄⁻³ soluble a las 72h con un pH de 4.28 (gráfico 7) correspondiente a un 10.42% de solubilización, con glucosa se obtuvieron 282mgL⁻¹ de PO₄⁻³ soluble a las 168h con un pH de 4.83 (gráfico 8) correspondiente a un 5.64% de solubilización. En comparación *Aneurinibacillus aneurinilyticus* que tiene una capacidad de solubilización de 260mgL⁻¹ (5%) con una concentración de 5gL⁻¹ de PTC, que es un aumento en el porcentaje de solubilización de 49% (Anjali *et al.*, 2017).

Para cuantificar la biomasa y medir el crecimiento por medio de peso seco se observa en los gráficos 9 y 10 una interferencia con el fosfato remanente en el filtro, lo cual hacer que se sobre estime la cantidad de biomasa. La mayor cantidad de PO₄⁻³ soluble (26%) se obtuvo con sacarosa en medio líquido a las 72h para los siguientes ensayos se utilizara este compuesto como fuente de carbono.

La concentración de fosfato insoluble (50 mgL⁻¹) en el ensayo para la determinación de biomasa, se realizó la medición del crecimiento de *A. nigricans* por medio de cuenta de células en la cámara de Neubauer y utilizando la ec. 1, el inóculo para la cinética fue de 1*10⁸ celml⁻¹. La solubilización en condiciones de 28°C, 125rpm y 50mgL⁻¹ (PTC) en la cinética fue de 39mgL⁻¹ (78%) a las 96h con un pH de 4.01 (gráfico 11), la tendencia de PO₄⁻³ soluble aumenta a las 48h y se mantiene hasta las 96h disminuyendo a un 12% el PO₄⁻³ soluble, esto se debe a

que el microorganismo entra en la etapa de enquistamiento y el P es consumido. La cantidad de células se mantiene en estado estacionario desde las 72h (gráfico 12), esto ayuda a concluir que la mayor cantidad de fosfato soluble que ocurre a las 96h indica que este proceso se lleva en la fase estacionaria del microorganismo.

El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son movilizados es la disminución del pH del medio por la liberación de ácidos orgánicos (Alexander, 1980). Para verificar la producción de los ácidos orgánicos (Baziramakenga *et al.*, 1995) en el medio se utilizó verde de bromocresol como indicador de pH que vira a color amarillo a pH 4 (fig. 15) con una concentración inicial de 1gL^{-1} de PTC, las 96h siendo las más representativas ya que el pH del medio bajo hasta 4.2 y logrando una solubilización de 851.5 mgL^{-1} (85%) de fosfato soluble en el medio, disminuyendo un 4% a las 168h. en cuanto al aumento de pH hasta 6.8 este se debe al efecto de H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} que se comportan como ácidos débiles separados porque los valores de pK ($\text{pK}_1= 2,2$; $\text{pK}_2= 7,2$, $\text{pK}_3=12,7$) sucesivos difieren en más de 4, para cada ácido, el pH a la mitad de la neutralización es igual al valor de pK del ácido por lo que no se mantendrá en valores de pH muy bajos y muy altos (Baeza. 2006). El crecimiento exponencial termina a las 120 h dónde se observa el cambio a estado estacionario (gráfico 14). Las tinciones de Gram (fig. 16) muestran la germinación de algunos quistes a las 24 h, sin embargo, se observa la presencia de quistes sin germinar posiblemente causado por el estrés generado por la falta de nutrientes. A las 96h se obtiene la mayor actividad del microorganismo en cuanto a solubilización alcanzando pH de 4.2, por último a las 168 h es decir el séptimo día *A. nigricans* está en su mayor parte enquistado debido a la falta de nutrientes.

La disminución de PO_4^{3-} soluble en el medio de un 4% a las 140h de debe a que es consumido por el microorganismo para entrar en fase de enquistamiento o para crecimiento.

Otra cinética sin fuente de nitrógeno fue llevada a cabo debido a que *A. nigricans* es una bacteria Gram negativa capaz de fijar nitrógeno atmosférico (García E. *et*

al., 2009); para cuantificar el nitrógeno así como la solubilización de P, logrando una comparación de fosfato soluble con fuente de nitrógeno y sin nitrógeno (N₂) (gráfico 15 y 17) en los cuales se alcanza una solubilización de 809mgL⁻¹ (80%) con fuente de N₂ contra un 530mgL⁻¹ (53%) sin fuente de N₂, ambos alcanzados a las 96 h con un pH de 4.2 en ambos casos, al igual que en experimentos anteriores se observa un decremento (22%) en el fosfato soluble a las 168h, el crecimiento para ambas cinéticas se contaron las células al igual que en otros ensayos a las 96h se encuentra en fase exponencial al igual que sin fuente de N₂. Para la fijación de nitrógeno (gráfico 19) se obtiene una fijación máxima a las 96h con 23mgL⁻¹, varía mucho en toda la cinética ya que es consumido por el microorganismo. Se han realizado trabajos acerca de la capacidad de los microorganismos para solubilizar fosfato y fijar nitrógeno, por medio de la actividad de fosfatasa y nitrogenasa, pero no cuantificando el fosfato y nitrógeno total del medio.

Los ácidos orgánicos se observan en la figura 15, las manchas que se observan en el cromatofolio corresponden al ácido orgánico presente en el medio con fuente de nitrógeno del cual su R_f es de 0.37, el cual es equivalente al ácido málico de acuerdo a lo reportado por Bajpai y Rao, (1971). El cromatofolio de la figura 17 muestra los ácidos orgánicos producidos en la cinética sin fuente de N₂.

La prueba de aplicación con PDA que es un fertilizante que es parcialmente soluble en un 47% correspondiente a 2.35gL⁻¹ de fosfato soluble, las 96h se obtienen 4gL⁻¹ solubles lo cual indica una solubilización de 1.65gL⁻¹ (62%), con un total de 80%. La medición de crecimiento muestra un comportamiento similar obteniendo 6.23*10⁸célulasml⁻¹, a las 96h, en cuanto al nitrógeno fijado en el medio inicialmente se tienen 11mgL⁻¹, el nitrógeno total máximo obtenido a las 120h es de 172.5mgL⁻¹ donde en realidad se fijaron 160mgL⁻¹, aportando un 92% de N al medio. En cuanto al pH este se mantiene constante en un intervalo de 7.52 a 7.9 y como se mencionó antes esto es debido al efecto de H₂PO₄⁻ y HPO₄⁻² que se comportan como ácidos débiles provocando que el pH se amortigüe. En la figura 19 se muestra el cromatofolio donde por su R_f=0.37 calculado se obtiene ácido málico y 0.21 correspondiente a ácido succínico (Bajpai y Rao, 1971),

además de otros ácidos a los cuales no se les pudo calcular su Rf. La figura 20 muestra las tinciones de Gram para la cinética con PDA, donde se observa el estado del microorganismo.

La prueba con lodos residuales del tratamiento de aguas residuales domesticas e industriales de la planta de “San Juan de Aragón” tienen un DQO de 1071mgL^{-1} , inicialmente el fosfato total en el medio es de 10.4mgL^{-1} , se agregó PTC en 5gL^{-1} obteniendo una solubilización de 1.56gL^{-1} (32.7% de fosfato soluble), de manera que se enriqueció el medio con fósforo y en nitrógeno total a las 120h de 50mgL^{-1} , y un crecimiento de $6.55 \times 10^8 \text{celml}^{-1}$, el medio puede ser utilizado como un fertilizante ya que cuenta con nutrientes como son el fósforo y nitrógeno necesarios para el crecimiento. Para lograr dicha solubilización los ácidos orgánicos producidos que se lograron identificar por medio de su Rf fueron málico con un Rf de 0.37 y succínico (Rf=0.21) visible en la figura 21. Por último la figura 22 muestra las tinciones de Gram en donde se observan las células muertas de los lodos residuales utilizados y las células del cultivo de *A. nigricans*, microorganismo que solubiliza fosfato.

Lo anterior permite una comparación de las distintas fuentes de nitrógeno utilizadas en relación a la solubilización de fosfato (Tabla 7.), en primer lugar el sulfato de nitrógeno es el que le proporciona el nitrógeno necesario para llevar a cabo los procesos bioquímicos correspondientes, y resultando una solubilización de 85%, acerca de las otras tres fuentes de nitrógeno: fijado por *A. nigricans*, proporcionado por PDA y el que permanece en los lodos residuales obtienen resultados positivos de solubilización, hasta un 80% con PDA.

Tabla 7. Resultados globales, utilizando *A. nigricans*, todas las cinéticas se incubaron a 28°C y 125rpm.

Fuente de Carbono	[PTC] (gL^{-1})	Comentario	PO_4^{-3} total (mgL^{-1})	N_{total} (mgL^{-1})	pH	%
Sacarosa	5	-	521	NA	4.28	10.42
Glucosa	5	-	264	NA	4.8	5.64
Sacarosa	0.05	-	39.3	NA	4.01	78
Sacarosa	1	Verde de bromocresol	851	NA	4.2	85

Sacarosa	1	(NH ₄) ₂ SO ₄	809.5	NA	4.66	80
Sacarosa	1	Sin N	533.5	23.05	4.2	53
Sacarosa	5	DAP	3960	172.5	7.02	80
Sacarosa + Carbohidratos presentes	5	Lodos residuales	1580 ¹	87	4.63	32.7

Saha *et al.*, 2014 trabajo con *A. chroococcum* MAL-201 para solubilizar fosfato tricálcico logrando un 87% (87mgL⁻¹) de solubilización en 100mgL⁻¹ de PTC en pH de 7 a 6. Lin *et al.*, 2006 con *Burkholderia cepacia* CC-A174 lograron una solubilización de 376mgL⁻¹ (7.5%) en pH de 8 a 3 con 5gL⁻¹ de PTC. Por lo anterior se puede concluir que la cepa *A. nigricans* es capaz de solubilizar fosfato más que otros microorganismos pero a su vez se asemeja su capacidad con *A. chroococcum*.

A. nigricans es un microorganismo capacidades bioquímicas competentes para aplicaciones potenciales por un lado remediando el suelo contaminado por queroseno (removiendo 50%), es capaz de formar una asociación planta bacteria Atlas y Barthe,1998); es además fijador de nitrógeno atmosférico y solubiliza fosfato tricálcico (posiblemente siendo capaz de solubilizar otro tipo de compuestos insolubles asociados al fosforo (Torriani-Gorini, 1994)) asimilando lo como fuente de fósforo, por lo que la implementación del microorganismo en un medio deficiente de estos nutrientes es ventajoso ya que los costos se pueden reducir en la utilización de fertilizantes por medio de la formulación de un biofertilizantes de manera que los costos se reduzcan.

9. CONCLUSIONES

- Se demostró la capacidad de *A. nigricans* para solubilizar TCP tanto en medio líquido como sólido en concentraciones de hasta 850gL⁻¹.
- Las fuentes orgánicas de carbono tienen un muy papel importante en la visualización del halo de solubilización de TCP, debido a que durante su asimilación se producen ácidos orgánicos que acidifican el medio, lo que hace posible dicho proceso. Se lograron identificar los ácidos málico y succínico por cromatografía de capa fina (TLC).
- Se demostró la capacidad *A. nigricans* para crecer en ausencia de nitrógeno, lo que comprueba que es un microorganismo fijador de nitrógeno atmosférico tanto en medio líquido como en sólido.
- El grado de solubilización del fósforo presente en PDA fue de 80% y una fijación de nitrógeno de 172.5mgL⁻¹, generando un medio rico en nutrientes.

10. RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas de solubilización con otros complejos insolubles como fosfato de aluminio (AlPO_4), fosfato de magnesio ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) y fosfato férrico (FePO_4).
2. Estandarizar de las condiciones operación para la solubilización de fosfato de DAP y lodos residuales para mejorar los rendimientos (pH, temperatura, agitación, inóculo).
3. Llevar a cabo el escalamiento a nivel reactor en tanque agitado para la solubilización de fosfato de DAP y lodos residuales.
4. Identificar de manera cualitativa y cuantitativa para determinar los ácidos orgánicos producidos durante el proceso de solubilización, empleado cromatografía de líquidos de alta resolución para determinar su concentración.
5. Preparar diferentes formulaciones de fosforo y nitrógeno para la producción y evaluación de un biofertilizante como agente promotor de crecimiento.

11. REFERENCIAS

- Alexander M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. En: Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor, México, 491: pág. 355-371.7.
- Anjali C., Shiwani G., Praveen P. B., Abhishek W., Rishi M., Preeti M., y Chand K. S. 2017. Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. Braz J. Microbiol. 48(2), pág. 294–304.
- Atlas R. M. y Bartha R. 1998. Microbial ecology: fundamentals and application. By Benjamin/cummings Publishing Company, Inc. Addison-Wesley Publishing Company. ISBN 0-805.-0655-2.
- Baeza A. 2006 Química analítica, Reacciones en disolución y en las interfaces en condiciones de amortiguamiento simple, pág. 183.
- Bajpai P.D. y Sundara Rao W. V. B. 1971. Phosphate solubilising bacteria Soil Science and Plant Nutrition, 17 (2): pág. 44-45.
- Bashan Y., Holguín G. y Ferrera-Cerrato, R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizósfera. Terra 14(2): pág. 195- 210.
- Baziramakenga R., Simard R. R. y Leroux G. D. 1995. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. Soil Biol. Biochem. 27: pág. 349-354
- Beever R. E. y Burns D. J. W. 1980. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. Adv. in Bot. Res. 8: pág. 121-219.
- Beltran M. E. 2014. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Corpoica Cienc. Tec. Agropec. 15(1): pág.101-113.

- Bermejo H. 1980. Los Fertilizantes, su fabricación e importancia agrícola en Venezuela. CONICIT & Ediciones Amon.
- Boddey R.M. y Döbereiner J. 1988. Nitrogen fixing associated with grasses and cereals: Recent results and prespective for future research. *Plant and Soil*. 108: pág. 53-65.
- Chaveevan L., Pimtida R., Pikul H., Hidenori S. y Ken S. 2009. Development of a New Biofertilizer with a High Capacity for N₂ Fixation, Phosphate and Potassium Solubilization and Auxin Production, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (5): pág. 1098–1101.
- Cordell D., Drangert J. y White S. 2009. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19: pág. 292–305.
- Edi–Premono M., Moawad M. A. y Vleck P. L. G. 1996. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian J. Crop. Sci.* 11: pág. 13–23.
- Espín G. 2003. Biología de *Azotobacter vinelandii*. JC (eds). Microbios en línea. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>
- García-Esquivel G. 2001. Características fisiológicas y bioquímicas de la biodegradación de queroseno y fijación de nitrógeno, por un cultivo aislado de la rizósfera. Tesis de Maestría en Ciencias, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. México. Director de tesis, Dr. Fernando José Esparza García.
- García-Esquivel G. 2008. Papel fisiológico de *Azotobacter nigricans* durante la remoción de queroseno en la rizósfera. Tesis CINVESTAV, pág. 29-62; 124-126 Director de tesis, Dr. Fernando José Esparza García.
- García-Esquivel G., Calva-Calva G., Ferrera-Cerrato R., Fernández-Linares, Rodríguez Vázquez R. y Esparza-García F. J. 2009. Encystment of *Azotobacter nigricans* grown diazptrophically on kerosene as sole carbon source. *Arch Microbiol.* 191: pág. 275–281.

- Garg S. K., Bhatnagar A. y Narula N. 1998. Application of *Azotobacter* enhances pond productivity and fish biomass in still water ponds. *Aquaculture International* 6, pág. 219–231.
- Garg S. K., Bhatnagar A., Kalla A. y Narula N. 2001. “In vitro” nitrogen fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in an aquatic system. *Bioresource Technology*. 80: pág.101-109.
- Gauri S. S., Santi M. M. y Bikas R. P. 2012. Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 95: pág. 331-338.
- Goldstein A. H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* 1: pág. 51-57.
- Goldstein A. H., Rogers R. D. y Mead G. 1993. Separating phosphate from via bioprocessing. *Biotechnology* 11: pág.1250-1254.
- Goldstein AH. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biol Agric Hort* 12: pág.185–193.
- Goldstein A., Lester T. y Brown J. 2003. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochim.Biophys.ActaProteins and Proteomics* 1647: pág. 266-271.
- Hans G. S. 1990. Nitrogen fixation. In: Hans G. Schlegel 1990. *General Microbiology*. Cambridge University Press. Great Britain. pág. 398-405.
- Illmer P. y Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 24: pág. 389-395.
- Illmer P. y Schinner F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27: 257-263.

- INPI. 2018. Fuentes de Nutrientes Específicos, www.ipni.net/specifics
- Jiang H. L., Tay J. H y Tay S. T. L. 2003. Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading *Appl Microbiol Biotechnol.* 63: pág. 602–608.
- Jones D. L., Dennis P. G., Owen A. G. y Van Hess P. A. W. 2003. Organic acid behavior in soils-misconceptions and knowledge gaps. *Plant Soil* 248: pág. 31-41.
- Keeney D. R. 1982. Nitrogen management for maximum efficiency and minimum pollution. *Farmed soils, fertilizer, and agroecosystems. Agronomy. A series of monographs-Americans Society of Agronomy.* 22: pág. 605-649.
- Kirkby E., Johnston A. 2008. Soil and fertilizer phosphorus in relation to crop nutrition. En Hammond, JP; White, PJ. Eds. *The ecophysiology of plant–phosphorus interactions.* Dordrecht, Holanda, Springer, pág. 177–223.
- Kucey R. M. N, Janzen H. H. y Leggett M. E. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron.* 42: pág.199-228.
- Lin T. F., Huang H. I., Shen F. T., Young C. C. 2006. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresource Technology* 97, pág. 957 - 960
- Manning D. A. C. 2008. Phosphate minerals, environmental pollution and sustainable agriculture. *Elements*, 4: pág. 105-108.
- Mardad I., Serrano A., y Soukri A. 2013. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 7(8), pág. 626-635.
- Munuera-Velez G. A. y Meza-Sepúlveda D. C. 2012. El fosfato elemento indispensable para la vida vegetal. Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología Química. Laboratorio de Análisis de Suelos.

- Nautiyal C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: pág. 265-270.
- Oelkers E. H. y Valsami-Jones E. 2008. Phosphate mineral reactivity and global sustainability. *Elements*, 4: pág. 83-88.
- Paredes-Mendoza M. y Espinosa-Victoria D. 2009. Organic Acids Produced by Phosphate Solubilizing Rhizobacteria: A Critical Review. *Terra latinoamericana* volumen 28 número (1).
- Prangya P. 2005. Evaluation of *Azotobacter* and *Azospirillum* as Biofertilizers in aquaculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: pág. 1339–1343.
- Pikovskaya R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: pág. 362-370.
- Pradel E. y. Boquet P. L. 1988. Acid phosphatases of *Escherichia coli*: molecular cloning and analysis of *agp*, the structural gene for the periplasmic acid glucose phosphatase. *J Bacteriol* 170: pág. 4916 – 4623.
- Ramanathan V., Cicerone R. J., Singh H. B. y Kiehl. 1985. Trace gas trends and their potential role in climate change. *J. Geophys. Res.* 90: pág. 5547-5566.
- Rehm B. H. A. 2005. Biosynthesis and applications of alginates. En. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. pág. 1-9.
- Rennie R. J. 1981. A single medium for the isolation of acetylenereducing (dinitrogen) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27: pág. 8–14.
- Richardson A. E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Austr. J. Plant Physiol.* 28: pág. 897-906.
- Rodríguez H. y Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339.

- Rooney D., Clipson N. 2009. Phosphate addition and plant species alters microbial community structure in acidic upland grassland soil. *Microb. Ecol.* 57: pág. 4-13.
- Rubio G. 2002. Conectando el fósforo del suelo con la planta. *Informaciones agronómicas del cono sur* 16: pág. 19-23.
- Sabra W, Zeng AP, Deckwer WD. 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:315–325.
- Saha P. S., Bhattacharyya S. y Chakraborty H. 2014. Solubilization of tricalcium phosphate by P(3HB) accumulating *Azotobacter chroococcum* MAL-201. *World J Microbiol Biotechnol*, 30: pág.1575–1582.
- Sagoe C. I., Ando T., Kouno K. y Nagaoka D. T. 1998. Effects of organic-acid treatment of phosphate rocks on the phosphorus availability to Italian ryegrass. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43: pág. 1067-1072.
- Scheffer F; Schachtschabel P. 1992. *Textbook of Soil Science*. Publisher Enke Stuttgart, pág. 280-284.
- Shadoff V. H. L. 1975 Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacter Rev* 39: pág. 516–539.
- Shekhar C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms; *Agricultural Microbiology Division, National Botanical Research Institute, FEMS Microbiology Letters* 170.
- Stevenson F. J. 1967. Organic acids in soil. In: A. D. McLaren and G. H. Peterson. (eds). *Soil biochemistry*. Marcel Dekker. New York, NY, USA, pág. 119-146.
- Torriani-Gorini A. 1994. Regulation of phosphate metabolism and transport. *Phosphate in microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press. Washington, DC, USA, pág. 1-4.
- Vaccari D. 2009. La crisis del fósforo. *Investigación y Ciencia*, edición española de *Scientific American*. España 395: pág. 22-27.

- Valsami-Jones E. 2004. Phosphorus in Environmental Technology: Principles and Applications. IWA Publishing, London, pág. 656.
- Water Analysis Handbook. 2013. Edition 1. DOC316.53.01336. pág. 383-392, 537-543.
- Yanmei Y., Weiyi H. y Ying G. 2007. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate, World J Microbiol. Biotechnol. 24: pág. 1059–1065.

12. ANEXOS

ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVO

RENNIE COMPLETO

Solución A

Compuesto	Concentración por litro
K ₂ HPO ₄	0.8 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
NaCl	0.1 g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.025 g
NaFeEDTA	0.028 g
Extracto de levadura	0.025 g
Lactato de sodio 60%(v/v)	0.5 ml
Agar	15 g
Agua destilada	900 ml
pH	7.0

Solución B

Compuesto	Concentración por litro
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.06 g
Agua destilada	100 ml
pH	7.0

Ambas soluciones se esterilizan por separado a 121°C por 15min.

VITAMINAS

Biotina 5 µg

Ácido paraaminobenzoico (PABA) 10 µg

Las vitaminas se adicionan, previamente esterilizadas por filtración.

Pikovskaya (PVK)

Medio de cultivo de Pikovskaya (PVK) (Shekhar et al., 1999); en g/L

Nombre del compuesto	Concentración
Glucosa	1 g*L ⁻¹
Fosfato Tricalcico Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g*L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g*L ⁻¹
Cloruro de sodio NaCl	0.5 g*L ⁻¹
Sulfato de magnesio heptahidratado MgSO ₄ -7H ₂ O	0.1 g*L ⁻¹
Cloruro de potasio KCl	0.2 g*L ⁻¹
Extracto de levadura	0.5 g*L ⁻¹
Sulfato de manganeso monohidratado MnSO ₄ -H ₂ O	0.01 g*L ⁻¹
Sulfato ferroso Heptahidratado FeSO ₄ -7H ₂ O	0.005 g*L ⁻¹
Agua	993 ml

JIANG

Medio de cultivo de Jiang (Jiang et al., 2004), en g/L.

Nombre del compuesto	Concentración
EDTA sódico	0.0014 g*L ⁻¹
Sulfato ferroso FeSO ₄	0.001 g*L ⁻¹
Sulfato de calcio Ca(SO ₄) -H ₂ O	0.14 g*L ⁻¹
Cloruro de sodio NaCl	0.1 g*L ⁻¹
Sulfato de magnesio heptahidratado MgSO ₄ -7H ₂ O	1.4 g*L ⁻¹
Glucosa 6 fosfato C ₆ H ₁₃ O ₉ P	2 g*L ⁻¹
Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	4 g*L ⁻¹
Glucosa	5 g*L ⁻¹
Agua	969.4 ml

ANEXO B. METODOLOGÍA DE HACH®

Nitrógeno total, Hach

Método de digestión de persulfato (No. 10072), rango de prueba 2 – 150 mg/L N₂

Materiales.

Tubos de prueba “N HR total nitrogen reagent set”

DRB200 reactor

Pipetas

APDAador de luz

Digestión de Persulfato

1. Encender el reactor DRB200 a temperatura de 105°C
2. Añadir el contenido del reactivo de persulfato de nitrógeno total a cada uno de dos frascos de reactivos de digestión de hidróxido de nitrógeno total de HR. Asegúrese de limpiar cualquier reactivo que se encuentre en el borde de los viales.
3. Preparar la muestra: Añadir 0,5 ml de muestra a uno de los tubos.
4. Preparar el blanco: Añadir 0,5 ml de agua desionizada (incluida en el *kit*) al segundo tubo. Utilice solamente agua que esté libre de todas las especies que contienen nitrógeno como el agua desionizada proporcionada.
5. Colocar las tapas en ambos tubos. Agitar vigorosamente durante al menos 30 segundos para mezclar. El polvo no disuelto no afectará la exactitud de la prueba.
6. Colocar los tubos en el reactor y cerrar la tapa. Deje los viales en el reactor durante exactamente 30 min.
7. A los 30 min., retirar inmediatamente los tubos del reactor. Deje que los tubos se enfríen a temperatura ambiente.
8. Programar en el adaptador de luz; **394 N, Total HR TNT**. Para obtener información sobre las celdas de muestras.
9. Añadir el contenido de un Reactivo de Nitrógeno Total (TN) a cada vial.
10. Coloque las tapas en ambos tubos. Agitar durante 30 segundos

11. Iniciar el cronómetro. Para un tiempo de reacción de 3 min.
12. Después de que expire el temporizador, retire las tapas de los tubos. Añada un sobre de polvo TN Reactivo B a cada vial.
13. Colocar las tapas en ambos tubos. Agitar vigorosamente durante 15 seg para mezclar. El reactivo no se disuelve completamente. El polvo no disuelto no afectará la exactitud de la prueba. La solución comenzará a ponerse amarilla.
14. Iniciar el cronómetro. Para un tiempo de reacción de 2 min.
15. Muestra preparada: Cuando el temporizador expire, use una pipeta para colocar 2mL de la muestra preparada que ya fue digerida en un vial TN Reactivo C.
16. En blanco: Cuando el temporizador termine, utilice una pipeta para colocar 2mL del blanco digerido en el segundo tubo TN Reactivo C.
17. Colocar las tapas en ambos tubos. Invertir 10 veces para mezclar. Utilice inversiones lentas y de liberación para una recuperación completa. Los viales serán cálidos al tacto.
18. Iniciar el cronometro. A 5 minutos. Comienza el tiempo de reacción. El color amarillo se intensificará.
19. Cuando el temporizador termine, limpie el tubo en blanco.
20. Insertar el tubo en blanco en el porta celdas de 16 mm.
21. Presionar CERO. La pantalla muestra 0 mg / L de N.
22. Limpiar el vial de la muestra.
23. Insertar el vial en blanco en el porta celdas de 16 mm.
24. Presionar READ. Los resultados se muestran en mg / l N.

El blanco del reactivo se puede utilizar hasta 7 días para mediciones que usan el mismo lote de reactivos. Mantenga el reactivo en blanco en la oscuridad a temperatura ambiente (18-25 ° C). Si aparece una pequeña cantidad de floculo blanco dentro de una semana, deseche el reactivo en blanco y prepare uno nuevo.

Fundamento.

Una digestión alcalina de persulfato convierte todas las formas de nitrógeno en nitrato. Se añade metabisulfito sódico después de la digestión para eliminar interferencias de óxido de halógeno. El nitrato reacciona entonces con el ácido cromotrópico en condiciones muy ácidas para formar un color amarillo

Fosfato total, Hach®

Método de la digestión del molibdovanadato con persulfato de ácido (No. 10127), rango de prueba 1.0 – 100 mg/L PO_4^{3-} (HR)

Materiales.

Tubos de prueba “HR phosphorus”

DRB200 reactor

Pipetas

Adaptador de luz

Digestión de molibdovanadato con persulfato de ácido

1. Encender el reactor DRB200 a temperatura de 150°C
2. Iniciar programa 542 P Total HR TNT. Para obtener información acerca de las celdas de muestras.
3. Preparar el blanco: Añadir 5,0 ml de agua desionizada a un tubo de prueba de fósforo total.
4. Preparar la muestra: Añadir 5,0 ml de muestra a un frasco de prueba de fósforo total
5. Añada el contenido del sobre reactivo de persulfato de potasio a cada tubo.
6. Ponga la tapa en el tubo. Agitar para disolver el polvo.
7. Inserte el tubo en el reactor. Cerrar el reactor
8. Iniciar cronometro. Con un tiempo de reacción de 30 minutos.
9. Cuando el tiempo termine, retire cuidadosamente los tubos calientes del reactor. Coloque los en una gradilla de tubo de ensayo. Deje enfriar a temperatura ambiente.
10. Añada 2mL de solución estándar de hidróxido sódico 1,54 N a cada vial.

11. Ponga la tapa en el vial. Invertir para mezclar.
12. Utilice una pipeta de polietileno para añadir 0,5 ml de reactivo de molibdato a cada vial.
13. Ponga la tapa en el vial. Invertir para mezclar.
14. Iniciar cronometro. Con un tiempo de reacción de 7 minutos. Mida la muestra entre siete y nueve minutos después de la adición del reactivo molibdovanadato.
15. Limpie el tubo del blanco
16. Inserte el tubo del blanco en el porta celdas de 16mm.
21. Presionar CERO. La pantalla muestra 0 mg / L de N.
22. Limpie el tubo de la muestra.
23. Inserte el tubo en blanco en el porta celdas de 16mm.
24. Presionar READ. Los resultados se muestran en mg / l PO_4^{3-} .

El blanco del reactivo se puede utilizar hasta 7 días para mediciones que usan el mismo lote de reactivos. Mantenga el reactivo en blanco en la oscuridad a temperatura ambiente (18-25 ° C). Si aparece una pequeña cantidad de floculo blanco dentro de una semana, deseche el reactivo en blanco y prepare uno nuevo.

Fundamento.

Los fosfatos presentes en formas orgánicas y condensadas inorgánicas (meta-, piro- u otros polifosfatos) deben convertirse en ortofosfato reactivo antes del análisis. El pretratamiento de la muestra con ácido y calor proporciona las condiciones para la hidrólisis de las formas inorgánicas condensadas. Los fosfatos orgánicos se convierten en ortofosfatos por calentamiento con ácido y persulfato. El ortofosfato reacciona con molibdato en un medio ácido para producir un complejo mixto fosfato / molibdato. En presencia de vanadio, se forma el ácido molibdvanadofosfórico amarillo. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfato. Los resultados de la prueba se miden a 420nm.

ANEXO C. TABLAS DE RESULTADOS

Tabla 8. Crecimiento del cultivo de *A. nigricans* en medio de Rennie completo. Llevándose a 125rpm y 28°C por 120h.

Tiempo (h)	Concentración mg/L		Promedio	Desviación estándar
0	320	340	330	14.1421
3	320	400	360	56.5685
6	340	360	350	14.1421
9	460	560	510	70.7107
15	1020	1060	1040	28.2843
24	2072	1950	2011	86.2670
48	3700	3800	3750	70.7107
72	3900	4300	4100	282.8427
120	4300	4100	4200	141.4214

Tabla 9. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa incubándose a 28°C y 30°C por 240h a una concentración de 2.5gL⁻¹ de PTC.

Medio	Cepa	F de C	D c (mm)	D H (mm)	IS	D c (mm)	D H (mm)	IS
PVK	<i>A. nigricans</i>	Sacarosa	2.5	1.2	1.48	5	1.1	1.22
PVK	<i>A. nigricans</i>	Manitol	1	0	1	2	0	1
PVK	<i>A. chroococcum</i>	Sacarosa	1.5	0	1	1.2	0	1
PVK	<i>A. nigricans</i>	Manitol	1.5	0.5	1.33	2	0.6	1.3

Tabla 10. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, a una concentración de 2.5gL⁻¹ de PTC tricálcico y 0.01grL⁻¹ de verde de bromocresol incubándose a 28°C por 240h.

Medio	Cepa	F de C	Verde de BrC	D c (mm)	D H (mm)	IS
PVK	<i>A. nigricans</i>	Sacarosa	0.01	2	1.5	1.75
PVK	<i>A. nigricans</i>	Manitol	0.01	3	0.5	1.166
PVK	<i>A. chroococcum</i>	Sacarosa	0.01	4	0.5	1.125
PVK	<i>A. chroococcum</i>	Manitol	0.01	3.2	1.5	1.46

Tabla 11. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, a una concentración de 2.5gL⁻¹ de PTC tricálcico y 0.01grL⁻¹ de verde de bromocresol incubándose a 28°C por 240h

Medio	Cepa	F de C	Verde de BrC	D c (mm)	D H (mm)	IS
PVK	<i>A. nigricans</i>	Glucosa	0.01	4	5.8	2.45
Jiang	<i>A. nigricans</i>	Glucosa	0.01	3.7	3.5	1.94
PVK	<i>A. chroococcum</i>	Glucosa	0.01	5	4.5	1.9
Jiang	<i>A. chroococcum</i>	Glucosa	0.01	2.5	1	1.4

Tabla 12. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, a una concentración de 2.5gL⁻¹ de PTC y 0.01grL⁻¹ de verde de bromocresol incubándose a 28°C por 240h

Medio	Cepa	F de C	D c (mm)	D H (mm)	IS
PVK	<i>A. nigricans</i>	Glucosa	3.5	4	2.1
Jiang	<i>A. nigricans</i>	Glucosa	4.2	2.8	1.66

Tabla 13. Índice de solubilización, inóculo por medio de punción en la placa, a una concentración de 2.5gL⁻¹ y 5gL⁻¹ de PTC sin fuente de nitrógeno, incubándose a 28°C por 240h

Sin N 28°C	<i>A. nigricans</i> 5g/L Ca ₃ (PO ₄) ₂			<i>A. nigricans</i> 2.5g/L Ca ₃ (PO ₄) ₂		
	D _C (mm)	D _H (mm)	SI	D _C (mm)	D _H (mm)	SI
	5	2	1.4	1.5	2	2.333
	3	3	2	2	2	2
	1.5	2	2.333	1	2	3
	1.5	1	1.667	2	3.5	2.75
			1.85			2.521

Tabla 14. Solubilización de PTC (2.5gL⁻¹) por *A. nigricans* hasta las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono

T (h)	Biomasa (mg/L)	pH	PO ₄ ⁻ (mg/L)	D.E. PO ₄	D.E. pH	D.E. biomasa
0	0.12	6.8	0	0.0253	0.05	0.215366
24	960	5.48	91	1.5236	0.3	1.025486
48	1920	4.72	212	2.3255	0.04	0.455156
72	2880	4.28	521	1.2221	0.17	0.891452
96	3840	4.76	478	3.2486	0.02	0.576142
120	4800	5.5	443	2.2247	0.03	1.361478
144	5760	5.2	317	1.2365	0.04	0.015652
168	6720	6.28	286	2.2448	0.03	0.017985

Tabla 15. Solubilización de PTC (2.5gL⁻¹) por *A. nigricans* las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con glucosa como única fuente de carbono.

T (h)	Biomasa (mg/L)	PO ₄ (mg/L)	pH	D.E. Biomasa	D.E. PO ₄	D.E. pH
0	0.12	0	6.89	0.24	0.025	0.12
24	2.2644	98.45	6.05	0.25	1.523	0.49497
48	1.9678	248.5	5.445	0.32	2.325	0.06363
72	2.5056	237.8	5.205	0.31	1.222	0.14849
96	2.425	264.5	5.305	0.27	3.248	0.30405

120	2.36	262	5.03	0.47	2.224	0.02828
144	2.4946	251.5	4.895	0.17	1.236	0.03535
168	2.7078	282.5	4.83	0.012	2.245	0.02828

Tabla 16. Solubilización de PTC a una concentración de 50mgL⁻¹ por *A. nigricans* hasta las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono

T (h)	Biomasa g/L	pH	Células/ml	PO ₄ mg/L	D. E. pH	D. E. Células	D.E. Biomasa	D.E. PO ₄
0	0.040892	6.08	8.00E+06	0	0	0	0	0
24	0.1881	4.45	2.59E+07	12.95	0.0565	1590990.3	0.06830	5.3033
48	0.2155	4.34	4.75E+07	17.4	0.0141	14142136	0.06208	2.2627
72	0.2689	4.015	7.38E+07	35.45	0.1484	1767767	0.01202	5.5861
96	0.2689	4.01	8.60E+07	39.3	0.1484	1767767	0.01202	0.5656
120	0.2609	4.015	1.20E+08	38.2	0.0212	21213203	0.04072	3.6769
144	0.275	4.135	1.30E+08	35.4	0.2333	21213203	0.02503	1.4142
168	0.2767	4.35	1.30E+08	34.45	0.4525	24748737	0.01343	5.3033

Tabla 17. Solubilización de PTC a una concentración de 1gL⁻¹ por *A. nigricans* hasta las 168h de incubación a 28°C, 125rpm y con sacarosa como única fuente de carbono.

T (h)	Biomasa mg/L	PO ₄ mg/L	pH	Células	D.E. pH
0	1.0223	0	6.385	14500000	0
24	1.2376	490.5	5.11	35000000	0.2545
48	1.7306	626	4.66	65000000	0.01414
72	2.7728	724	4.51	86250000	0.02828
96	2.7639	851.5	4.275	142500000	0.1767
120	2.1974	819	5.725	188750000	0.5868
144	2.4974	821.5	6.69	191250000	0.01414
168	2.1899	816.5	6.81	197500000	0.01414

D.E. Células	D.E. Biomasa	D.E. PO ₄
1060660	0.01124	0
1.1E+07	0.21485	28.9913
7071068	0.358964	4.2426
1.2E+07	0.188568	59.3969
7071068	0.236848	3.5355
8838835	0.328896	55.1543
8838835	0.431335	21.9203
7071068	0.126448	7.7781

Tabla 18. Fosfato soluble por *A nigricans* con una concentración de 1gL^{-1} de PTC con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, incubado a 28°C , 125rpm y con sacarosa como fuente de carbono.

T (h)	Biomasa g/L	pH	Células/ml	PO ₄ mg/L
0	1.2358	6.74	1.70E+07	9
24	2.7226	5.255	2.03E+07	106
48	2.6626	4.795	4.88E+07	229.5
72	2.2734	4.825	9.75E+07	384.5
96	2.1134	4.815	1.75E+08	583.5
120	2.31	4.665	2.13E+08	809.5
144	2.1546	4.715	2.13E+08	789.5
168	2.306	5.04	2.13E+08	625.5

D.E. Biomasa	D.E. células	D.E. pH	D.E. PO ₄
0.136579	1.23225	0.13298	0.17825
0.01979	2121320.34	0.12021	8.485281
0.034789	26516504.3	0.02121	37.47666
0.05572	21213203.4	0.10606	5.161875
0.00961	14142135.6	0.02121	17.67766
0.00707	53033008.6	0.00707	7.778174
0.14849	17677669.5	0.14849	0.70710
0.077498	53033008.6	0.07071	3.53553

Tabla 19. Fosfato soluble por *A nigricans* con una concentración de 1gL^{-1} de PTC sin fuente de nitrógeno, incubado a 28°C , 125rpm y con sacarosa como fuente de carbono

T (h)	Biomasa g/L	pH	Células/ml	PO ₄ (g/L)	NO ₃ (mg/L)
0	2.3446	6.34	1.80E+07	9.6	6
24	3.0289	4.82	2.26E+07	90	14.1
48	3.1185	4.475	2.49E+08	229.5	21.55
72	3.3228	4.335	4.71E+08	375.5	16.1
96	3.1163	4.285	1.25E+09	533.5	23.05
120	2.5045	4.96	1.88E+09	507.5	19.55
144	3.22649	5.105	2.13E+09	483	19.25
168	3.0772	6.425	2.13E+09	467.5	14.65

D.E. Biomasa	D.E. PO ₄	D.E. cel	D.E. pH	D.E.NO ₃
0.1365795	1.232254	2.47E+06	1.060660	1.245631
0.1571191	1.414213	1.59E+06	0.0282841	2.969848
0.0142835	0.215367	5.30E+06	0.0494974	0.777817
0.1467953	1.202081	5.30E+06	0.007071	0.424264

0.0524673	1.62634	3.54E+08	0.049497	0.6363961
0.0530330	0.919238	1.77E+08	0.806101	1.697056
0.2648680	0.565685	1.77E+08	0.275771	0.212132
0.1077630	1.343502	1.77E+08	1.64755	0.212132

Tabla 20. Fosfato soluble por *A. nigricans* con una concentración de 5gL⁻¹ de PDA, incubado a 28°C, 125rpm con sacarosa como fuente de carbono.

T (h)	Biomasa g/L	pH	Células/ml	PO ₄ mg/L	NO ₃ mg/L	D.E. Biomasa	D.E. pH
0	0.8062	7.52	1.45E+08	2.44	122	0.02401	0.4949
24	0.02447875	6.795	2.60E+08	2.5475	125	0.04323	0.0353
48	0.04061	6.73	3.30E+08	2.875	148.5	0.05897	0.0284
72	0.054805	7.06	5.65E+08	3.22	159.5	0.09517	0.0565
96	0.051185	7.045	6.23E+08	3.9625	165.5	0.19728	0.0494
120	0.05091	7.005	6.40E+08	3.84	172.5	0.15215	0.007
144	0.04508025	7.03	6.53E+08	3.5175	158	0.15174	0.0565
168	0.0230775	7.94	6.60E+08	3.1575	152	0.12952	0.1245

D.E. células	D.E. PO ₄	D.E. NO ₃
91923881.6	0.09545	2.8284
21213203.4	0.03889	9.8994
63639610.3	0.0212	2.1213
42426406.9	0.13435	3.5355
24748737.3	0.13081	3.5355
7071067.81	0.3959	2.1213
10606601.7	0.6257	8.4852
7071067.81	0.2793	8.4852

Tabla 21. Fosfato soluble en lodos residuales por *A. nigricans* con 25ml a 5gL⁻¹ de PTC, incubado a 28°C, 125rpm con sacarosa como fuente de carbono.

T (h)	pH	Células/ml	PO ₄ mg/L	NO ₃ mg/L
0	8.03	1.43E+07	0.976	122
24	4.245	2.25E+07	1.019	125
48	4.26	3.13E+07	1.15	148.5
72	4.36	5.53E+07	1.288	159.5
96	4.63	6.05E+07	1.585	165.5
120	4.62	5.98E+07	1.536	172.5
144	4.675	6.48E+07	1.407	158
168	4.965	6.55E+07	1.263	152

D.E. pH	D.E. células	D.E. PO₄	D.E. NO₃
0.12356	4772970.77	0.12354	2.82842
0.00707	2121320.34	0.01555	9.89949
0.02828	3889087.3	0.00848	2.12132
0.02828	2474873.73	0.05374	3.53553
0.07071	4949747.47	0.05232	3.53553
0.05656	3181980.52	0.15839	2.12132
0.00707	1767766.95	0.25031	8.48528
0.03535	2121320.34	0.11172	8.48528

ANEXO D. ARTÍCULO.

ASSIMILATION OF INSOLUBLE PHOSPHATE BY *Azotobacter nigricans*, IN LIQUID MEDIUM

Vera García Sara Luz¹, Rodríguez Casasola Felipe Neri², Leal Ríos Elvira¹, Barrera Cortes Josefina¹, Cañizares Villanueva Rosa Olivia¹, García Esquivel Gabriela³, Esparza García Fernando José¹.

¹ Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Gustavo A. Madero, San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México, México.

² Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Miguel Hidalgo, Santo Tomás, 11340 Ciudad de México, CDMX

³ Calz. Gral. Mariano Escobedo 564, Anzures, 11590 Ciudad de México, CDMX

*Correspondig autor: saraluz.vera@cinvestav.mx

Abstract. Phosphorus (P) is an essential macronutrient for the growth and development of all living beings. This is a non-renewable resource and world reserves are depleted quickly, it's estimated to be halved between 2040 and 2060, which, together with the fact that prices for phosphorus fertilizers are constantly increasing, makes it necessary to seek sustainable forms of P. The availability of P in soil is low; is generally found in complex forms that are insoluble such as tricalcium phosphate. *Azotobacter sp.*, solubilize phosphate and allow it's availability. In this this work we evaluate *Azotobacter nigricans* for solubilization of P in Jiang medium, with an initial concentration of tricalcium phosphate of 2 gL⁻¹, with glucose there is a decrease in pH at 168 hours of 4.83 with 14.2% P solubilization, due to the production of organic acids, however in sucrose at 72 hours the pH of the medium is 4.28 with 26.05% solubilization.

Resumen. El fósforo (P) es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de todos los seres vivos. Este es un recurso no renovable y las reservas mundiales se agotan rápidamente, se estima que se redujo a la mitad entre 2040 y 2060, lo que, junto con el hecho de que los precios de los fertilizantes fosfóricos aumentan constantemente, hace que sea necesario buscar formas sostenibles de P. la disponibilidad de P en el suelo es baja; generalmente se encuentra en formas complejas que son insolubles, como el fosfato tricálcico. *Azotobacter sp.*, Solubiliza el fosfato y permite su disponibilidad. En este trabajo evaluamos *Azotobacter nigricans* para la solubilización de P en medio Jiang, con una concentración inicial de fosfato tricálcico de 2 gL⁻¹, con glucosa hay una disminución en el pH a las 168 horas de 4.83 con solubilización de P 14.2%, debido a la producción de ácidos orgánicos, sin embargo en la sacarosa a las 72 horas, el pH del medio es 4,28 con una solubilización del 26,05%.

Keywords. *Azotobacter nigricans*, Phosphate solubilization, Tricalcium phosphate, Liquid medium.

INTRODUCTION

The availability of Phosphorus (P) in soil is low since it is easily converted into insoluble complexes, such as Fe³⁺, Al³⁺ or Mn³⁺ and

Ca²⁺ or Mg²⁺ in acid or alkaline soils respectively (Torriani-Gorini, 1994).

Phosphate solubilizing bacteria (PSB) solubilize organic and inorganic phosphate (Goldstein *et al.*, 2003).

The most common mechanism of solubilization of the mineral phosphate is by the action of organic acids synthesized by the PSB (Wan and Wong, 2004).

This solubilization is attributed to low molecular weight organic acids such as: oxalic, citric, malonic, succinic, malic, fumaric, acetic, glutamic, gluconic originating from the metabolism of high molecular weight compounds, such as carbohydrates, peptides and lipids (Baziramakenga *et al.*, 1995).

Liu *et al.* (1992) propose that the solubilization is the result of the acidification of the periplasmic space, due to the direct oxidation of glucose or another aldose (non-phospholitic oxidation) by the action of the quinoprotein glucose dehydrogenase.

MATERIALS AND METHODS

Inoculum preparation

An Erlenmeyer flask containing 25 ml of complete Rennie liquid medium was inoculated with *A. nigrificans* and incubated at 28 °C, 125 rpm for 24 hours to achieve and inoculate 0.5 on the McFarland scale (10^8 CFU/ml)

Liquid medium

Jiang medium containing 2 gL⁻¹ of (Ca₃(PO₄)₂) was used to evaluate two sources of carbon sucrose and glucose.

Phosphate quantification

The supernatant was filtered through a nylon membrane of 11 μm and a second filtration at 0.45 μm, at which the quantification of soluble phosphate was carried out by the HACH Total phosphate Method of digestion of molybdate with acid persulfate No. 10127 (HACH Company, USA).

Statistics

Data represent the mean and standard deviation of two replicates. Excel software was used for statistical analysis for standard deviation

RESULTS

In the first essay with glucose the inoculum, whit a turbidity equivalent to 0.5 of McFarland represents approximately 10^8 CFU/ml.

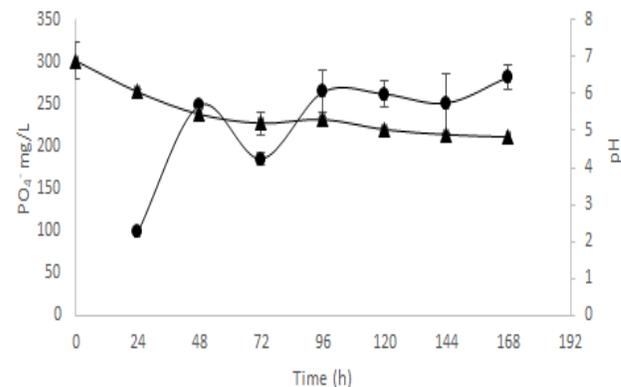


Fig.1. Phosphate solubilization by *A. nigrificans*. (Carbon source: Glucose, T= 28 °C, 125rpm) (PO₄⁻ (●) pH (▲)).

Table1. Soluble Phosphate by *A. nigrificans*, incubated at 28°C and 125 rpm, with glucose as a carbon source.

T (h)	PO ₄ ⁻ (mg/L)	pH
0	0	6.89
24	98.45	6.05
48	248.5	5.45
72	185.5	5.21
96	264.5	5.31
120	262	5.03
144	251.5	4.90
168	282.5	4.83

The second essay was carried out whit saccharose as a sole carbon source. The inoculum, also had a turbidity equivalent to 0.5 of McFarland.

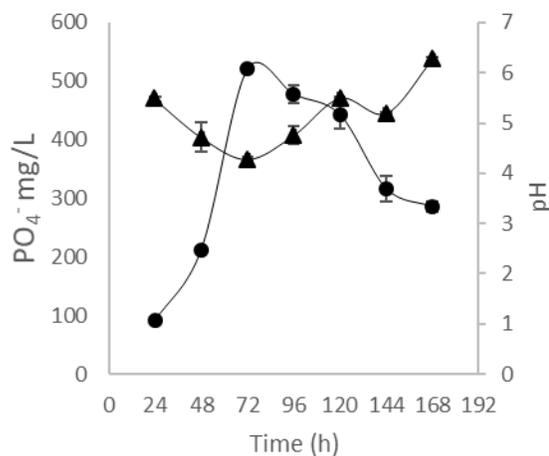


Fig.2. Phosphate solubilization by *A. nigricans*. (Carbon source: saccharose, T= 28 °C, 125 rpm) (PO₄⁻ (●) pH (▲)).

Table 2. Soluble Phosphate by *A. nigricans*, incubated at 28°C and 125 rpm, with saccharose as a carbon source.

T (h)	pH	PO ₄ ⁻ (mg/L)	Biomass mg/L
0	6.8	0	0
24	5.48	91	21.27
48	4.72	212	29.48
72	4.28	521	31.56
96	4.76	478	51.78
120	5.5	443	23.98
144	5.2	317	35.35
168	6.28	286	50.13

Fig.3. Biomass production and phosphate solubilization. (Carbon source: saccharose, T= 28 °C, 125 rpm) (PO₄⁻ (●) biomass (▲))

DISCUSSION

To carry out the solubilization of tricalcium phosphate (Ca₃(PO₄)₂), one of the main

factors is the change of pH in the medium through the production of organic acids (Mardad *et al.*, 2013, Illmer *et al.*, 1994).

A. nigricans best results was those carried on with saccharose as sole carbon source reaching a concentration of 521 mgL⁻¹ of soluble phosphate, equivalent to 26% of Ca₃PO₄ solubilization.

With glucose a concentration of 282.5 mgL⁻¹ of soluble phosphate was achieved.

In figure 1, a decrease in pH and a solubilization of 4.94% was observed. Due to a possible buffer reaction between tricalcium phosphate and organic acids, it was not possible to identify the organic acids by means of HPLC.

At 168 hrs pH drops to 4.83 and a solubilization of 14% was observed, this may be due of an increase in the organic acids concentration.

However, in Figure 2, the pH of the medium tends to drop the first 24 hours at 5.48, followed by a decrease until 72 hours, obtaining the highest solubilization of 521 mg/L corresponding to 26.05%.

As for the biomass, (Figure 3) an interference occurs when filtering with the nylon membranes since a large part remains in the first remaining phosphate filtrate.

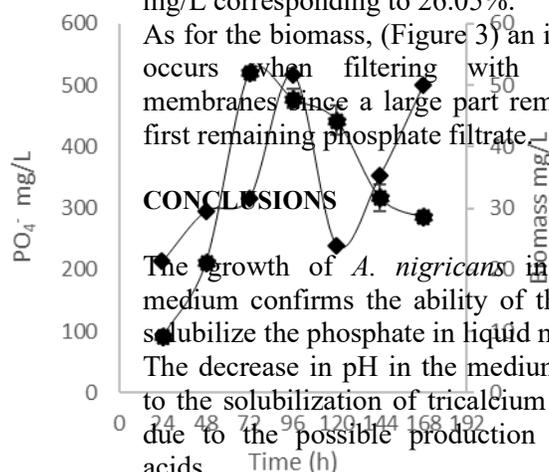
CONCLUSIONS

The growth of *A. nigricans* in the Jiang medium confirms the ability of the strain to solubilize the phosphate in liquid medium.

The decrease in pH in the medium is related to the solubilization of tricalcium phosphate, due to the possible production of organic acids.

The carbon source has an important role in this mechanism since depending on the selection the solubilization index increases or decreases, this due to the production of different organic acids

The lowest pH reached in the kinetics with the *A. nigricans* strain is 4.16 obtaining a soluble phosphate concentration of 500 mg/L



and the best performance is 26% of solubilization.

REFERENCES

- [1] Baziramakenga, R., R. R. Simard, and G. D. Leroux. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biol. Biochem.* 1995;27:349-356. doi: [10.1016/0038-0717\(94\)00178-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00178-4)
- [2] Goldstein, A., T. Lester, and J. Brown. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta Proteins and Proteomics* 2003; 1647:266-271. doi: [10.1016/S1570-9639\(03\)00067-0](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00067-0)
- [3] Illmer P., Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 1994; Vol.27 No.3 pp. 257-263m doi: [10.1016/0038-0717\(94\)00190-C](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00190-C)
- [4] Liu, T. S., L. Y. Lee, C. Y. Tai, C. H. Hung, Y. S. Chang, J. H. Wolfram, R. Rogers, and A. H. Goldstein. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *J. Bacteriol.* 1992; 174: 5814-5819. doi: [10.1186/1471-2180-8-230](https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-230)
- [5] Mardad Ilham, Aurelio Serrano, Abdelaziz Soukri (2013), Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit, *African Journal of Microbiology Research* 2013; Vol. 7(8), pp. 626-635. doi: [10.5897/AJMR12.1431](https://doi.org/10.5897/AJMR12.1431)
- [6] Nautiyal C. Shekhar. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms *FEMS Microbiology Letters* 170 1999; 265-270. doi: [10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x)
- [7] Rennie R.J. A single medium for the isolation of acetylenoreducing (dinitrogen-Wxing) bacteria from soils. *Can J Microbiol* 1981; 27:8-14
- [8] Restrepo Franco G. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 2015; Vol. 46, No. 1, pp. 63-76.
- [9] Sagoe, C. I., T. Ando, K. Kouno, and T. Nagaoka. Effects of organic-acid treatment of phosphate rocks on the phosphorus availability to Italian ryegrass. *Soil Sci. Plant Nutr.* 1998; 43: 1067-1072. doi: [10.1080/00380768.1997.11863719](https://doi.org/10.1080/00380768.1997.11863719)
- [10] Stevenson, F. J. *Organic acids in soil. Soil biochemistry.* Marcel Dekker. New York, NY, USA. 1967; 119-146.
- [11] Strobel, B.W. Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution: A review. *Geoderma.* 2001; 99: 169-198. doi: [10.1016/S0016-7061\(00\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(00)00102-6)
- [12] Torriani-Gorini, A. Regulation of phosphate metabolism and transport. *Phosphate in microorganisms: Cellular and Molecular Biology.* ASM Press. Washington, DC, USA. 1994; 1-4.
- [13] Wan, J. H. C. and M. H. Wong. Effects of earthworm activity and P-solubilizing bacteria on P availability in soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2004;167:209-213. Doi: [10.1002/jpln.201100022](https://doi.org/10.1002/jpln.201100022)
- [14] *Water Analysis Handbook*, Edition 1. DOC316.53.01336. pp. 383-392, 537-543. 2013.



August 10th, 2018.

Manuscript number: ES2P1

Full-text paper: "ASSIMILATION OF INSOLUBLE PHOSPHATE BY *Azotobacter nigrigans*, IN LIQUID MEDIUM"

Authors: Sara Luz Vera García, Felipe Neri Rodríguez Casasola, Elvira Leal Rios, Josefina Barrera Cortes, Rosa Olivia Cañizares Villanueva, Gabriela García Esquivel, Fernando José Esparza García.

Corresponding author: Sara Luz Vera García

Submitted on: 2018-05-30

Decision date: 2018-08-10

Status: ACCEPTED FOR PUBLICATION

Dear Sara Luz Vera García,

We are pleased to inform you that your full-text paper: "ASSIMILATION OF INSOLUBLE PHOSPHATE BY *Azotobacter nigrigans*, IN LIQUID MEDIUM" has been accepted for publication in the special issue of the *JOURNAL OF BIOENGINEERING AND BIOMEDICINE RESEARCH (JBBR)*.

We would like to emphasize that in order to include your full-text paper in the proceedings, you need to send by e-mail your registration payment proof at the X International Congress, XXI National Congress on Biochemical Engineering and the XVI Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings, held in Mérida, Yucatán, Mexico, from March, 21st to 23th 2018.

Yours sincerely,

Deifilia Ahuatzi-Chacón, PhD
Rosa María Ribas-Aparicio, PhD
Editors.