



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias



Tesis

Para obtener el título de:

Licenciado en Biotecnología

“Solubilización de fosfato de calcio, aluminio y hierro en cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos”

Presenta:

Grecia Elena Gómez Mora

Director:

Dr. Gustavo Yáñez Ocampo

Codirectora:

Dra. Rocio Vaca Paulín

Septiembre 2024

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	6
2. ANTECEDENTES	8
3. MARCO TEÓRICO	13
3.1 Fósforo en el suelo	13
3.1.1 Abundancia y disponibilidad del fósforo en suelo	14
3.1.2 Ciclaje de Fósforo	15
3.1.3 Fosfato de aluminio y hierro en el suelo	16
3.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal	18
3.2.1 Definición y actividades de las BPCV	19
3.2.2 Selección de las BPCV	20
3.2.3 Interacción BPCV-planta	21
3.2.4 Solubilización de fósforo por bacterias promotoras del crecimiento vegetal	22
3.3 Solubilización de fósforo	23
3.3.1 Mecanismo bioquímico de solubilización de P	23
3.3.2 Método de índice de solubilización en medio sólido	25
3.3.3 Método espectrofotométrico de molibdato de amonio	26
4. JUSTIFICACIÓN	28
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVOS	29
Objetivo general	29
Objetivos particulares	29
7. MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1 Origen del cepario	30
7.2 Reactivación del cepario en agar nutritivo	30
7.3 Producción de inóculo en caldo nutritivo	32
7.4 Cosecha de biomasa por centrifugación	32
7.5 Ajuste de biomasa por densidad óptica	33
7.8 Diseño experimental	37
7.9 Análisis estadístico	37

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
8.1 Crecimiento de BSF y presencia de halo de solubilización	38
8.2 Índices de solubilización en agar Pikovskaya	40
8.3 Cinéticas de solubilización de fósforo en medio líquido	43
8.3.1 Fósforo soluble en medio líquido PKV	43
8.3.2 Comportamiento de pH en las cinéticas de solubilización de P en medio líquido PKV	46
8.3.3 Monitoreo de biomasa en cinéticas de solubilización de P en medio líquido PKV	49
9. CONCLUSIONES	51
10. REFERENCIAS	53

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Relaciones entre el ciclo del fósforo y los compartimientos orgánicos y minerales. Los cuadros negros son las entradas al sistema, los grises las fracciones disponibles, sin color las fracciones minerales; sin recuadro factores que tienen influencia en la disponibilidad de P. Fuente: Picone & Zamuner (2002).	16
Figura 2. El fósforo inorgánico y su precipitación en compuestos fosfatados insolubles. Fuente: Meza & Munera (2014).	18
Figura 3. Actividades metabólicas realizadas por los microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Fuente: Sharma et al. (2013).	20
Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de solubilización, mineralización e inmovilización del P del suelo. Fuente: Sharma et al. (2013). ...	25
Figura 5. Halo de solubilización formado por <i>P. lilacinus</i> en medio sólido con fosfato tricálcico a los 10 días. Fuente: Sharma et al. (2013).	26
Figura 6. Reactivación del cepario en agar nutritivo después de 24 horas de incubación. Fuente: elaboración propia.	31
Figura 7. Producción de inóculo en caldo nutritivo después de 12 horas de incubación.	32
Figura 8. Halos de solubilización al día 8 de incubación.	34
Figura 9. Representación esquemática de la medición de halos de solubilización y colonias bacterianas al día 8 de incubación en el programa ImageJ.	35
Figura 10. Crecimiento de biomasa después de 8 días de incubación. A: Fosfato de hierro. B: Fosfato de aluminio. C: Fosfato tricálcico.	39
Figura 11. Índice de solubilización de fósforo en medio PKV $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a los 0, 4 y 8 días de incubación. Nota: Bacterias solubilizadoras de fósforo, Cepas C1, C2, C3, C5, C6, <i>Bacillus subtilis</i> y un control sin biomasa ($x \pm$ desviación estándar). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$)	41
Figura 12. Solubilización de fósforo en medio PKV con AlPO_4 a los 0, 4 y 8 días de incubación. Nota: Bacterias solubilizadoras de fósforo, Cepas C1, C2, C3, <i>Bacillus</i>	

<i>subtilis</i> y un control sin biomasa ($x \pm$ desviación estándar). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).....	44
Figura 13. Solubilización de fósforo en medio PKV con FePO_4 a los 0, 4 y 8 días de incubación. Nota: Bacterias solubilizadoras de fósforo, Cepas C1, C2, C3, <i>Bacillus subtilis</i> y un control sin biomasa ($x \pm$ desviación estándar). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).....	45
Figura 14. pH en el medio PKV con AlPO_4 y cepas bacterias solubilizadoras de fósforo, C1, C2, C3, <i>Bacillus subtilis</i> y control sin biomasa ($x \pm$ desviación estándar).....	47
Figura 15. pH en el medio PKV con FePO_4 y cepas de bacterias solubilizadoras de fósforo, C1, C2, C3, <i>Bacillus subtilis</i> y control sin biomasa ($x \pm$ desviación estándar).....	48
Figura 16. Cuantificación por densidad óptica de la biomasa de las cepas bacterianas solubilizadoras de fósforo, C1, C2, C3, <i>Bacillus subtilis</i> y control sin biomasa, cultivadas en medio PKV con AlPO_4 ($x \pm$ desviación estándar).....	49
Tabla 1. Antecedentes de índice de solubilización de fósforo (ISP).....	9
Tabla 2. Antecedentes de concentración de fósforo soluble en medio líquido.	11
Tabla 3. Composición de medio agar nutritivo	31
Tabla 4. Composición de medio agar Pikovskaya.....	34
Tabla 5. Crecimiento y detección de halo de solubilización en las cepas bacterianas en medio agar Pikovskaya después de 8 días de incubación.	40

1. INTRODUCCIÓN

El fósforo es un elemento esencial para los sistemas biológicos y ocupa el tercer lugar en importancia después del nitrógeno. En el suelo, se encuentra en forma inorgánica insoluble; por lo que, no está biodisponible para los organismos. Es indispensable para funciones bioquímicas tales como la fotosíntesis, respiración y fijación de nitrógeno (Khan *et al.*, 2010).

La presencia de fosfato de hierro (FePO_4) y aluminio (AlPO_4) en suelos ácidos es uno de los principales motivos de su baja disponibilidad; mientras que, en suelos alcalinos es el fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; por lo que, es necesario el uso de fertilizantes para la suplementación del P en los suelos agrícolas; sin embargo, solo se aprovecha un 30% ya que lo demás es fijado en compuestos fosfatos inorgánicos insolubles (Banerjee *et al.*, 2010).

La solubilización de fosfatos se ha vuelto un tema de gran importancia en el desarrollo de biofertilizantes para una agricultura sostenible (Ahemad *et al.*, 2014; Punam *et al.*, 2018), debido a que el fósforo es un elemento indispensable para el transporte de nutrientes y crecimiento de raíces (Khan *et al.*, 2010).

En este sentido, recientemente se han desarrollado protocolos para el aislamiento y aprovechamiento biotecnológico de bacterias solubilizadoras de fosfatos para ser empleadas como biofertilizantes mediante la evaluación del índice de solubilización en medios de cultivo selectivos sólidos y líquidos.

Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) representan una alternativa ecológica para la restauración de suelos. A través de la solubilización de minerales como el P se da la recuperación de la fertilidad del suelo con erosión química y carencia de fósforo (Punam *et al.*, 2018). Uno de los mecanismos principales es la colonización en la raíz de las plantas, esto promueve la liberación

de ácidos orgánicos por medio de la reducción del pH del suelo, cambios redox y aumento de actividad microbiana (Bashan *et al.*, 2014).

Es por lo antes expuesto que en el presente trabajo se pretende evaluar la solubilización de fosfato de calcio, aluminio y hierro, en cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos que promueven el crecimiento vegetal para su potencial uso en la biotecnología agrícola como biofertilizante.

2. ANTECEDENTES

Con el fin de proporcionar una comprensión integral y actual sobre los principales trabajos relacionados con la presente propuesta de investigación se han elaborado las Tablas 1 y 2 de antecedentes. La Tabla 1 presenta los índices de solubilización (ISP) de bacterias solubilizadoras de fosfatos en tres fuentes diferentes de fósforo: fosfato tricálcico, de aluminio y hierro.

En 2022, Aliyat y colaboradores reportaron distintos ISP dentro del rango de 2.77 a 4.79 al investigar el fosfato tricálcico. Cabe señalar que, la atención se centra principalmente en el ISP sobre esta fuente específica de fósforo. Al igual que la investigación realizada por Inácio y colaboradores en 2017 que reportaron índices de solubilización de 6.20 y 2.70. Sharma y colaboradores (2013), obtuvieron ISP de 3.10 y 3.00, de igual manera que Mardad y colaboradores (2013), reportaron ISP dentro del intervalo de 3.60 a 4.40.

Por el contrario en 2017, Dos Santos y colaboradores emplearon fosfato tricálcico y de hierro como fuentes de fósforo. Sus hallazgos se refieren exclusivamente a la solubilidad del calcio, ya que en el caso del hierro no se detectaron halos de solubilización observables.

A diferencia de las otras investigaciones Islam y colaboradores (2007), utilizaron las tres fuentes de P, pero solo obtuvieron ISP de fosfato tricálcico; reportando índices dentro del rango de 3 a 6.70. En los fosfatos de aluminio y hierro no hubo presencia de halos de solubilización por lo que no se reportó índice de solubilización.

Al examinar los esfuerzos de investigación anteriores, se hace evidente que existe una insuficiencia de información sobre la solubilización de las tres fuentes de fósforo. Esta escasez de conocimiento subraya la necesidad de realizar más

investigaciones para dilucidar la importancia de la solubilización del fosfato de aluminio y hierro.

Tabla 1. Antecedentes de índice de solubilización de fósforo (ISP).

Referencia	Bacteria solubilizadora de fósforo (BSF)	Índice de solubilización		
		Fuente de P		
		AlPO ₄	FePO ₄	Ca ₃ (PO ₄) ₂
Aliyat <i>et al.</i> , 2022	BM11	NS	NS	3.33
	BM28	NS	NS	4.10
	CB19	NS	NS	4.79
	CB13	NS	NS	2.77
	BT125	NS	NS	4.12
	BT3S171	NS	NS	2.77
	BN313	NS	NS	3.11
	BM218	NS	NS	4.00
	BM215	NS	NS	3.42
Inácio <i>et al.</i> , 2020.	BSF-ora			6.20
	BSF-pic			2.70
Dos santos <i>et al.</i> , 2017.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		NS	4.80
	<i>Bacillus sp.</i>		NS	4.70
	<i>Bacillus pumilus</i>		NS	3.20
	<i>Streptomyces sp.</i>		NS	1.70
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		NS	1.50
	<i>Micrococcus luteus</i>		NS	1.16
Sharma <i>et al.</i> , 2013.	<i>Pseudomonas sp.</i>			3.10
	<i>Bacillus sp.</i>			3.00

	BSF 4			4.14
Mardad <i>et al.</i> ,	BSF 5			3.67
2013.	BSF 6			4.40
	<i>Acinetobacter sp.</i> BR-12	NS	NS	4.60
	<i>Klebsiella sp.</i>	NS	NS	4.80
Islam <i>et al.</i> ,	<i>Acinetobacter sp.</i> BR-25	NS	NS	6.70
2007.	<i>Enterobacter sp.</i>	NS	NS	3.00

Nota: NS no se reportan índices de solubilización

La Tabla 2 presenta la concentración de fósforo soluble [P] mg/L en medio líquido de bacterias solubilizadoras de fosfatos en 3 diferentes fuentes de fósforo: fosfato tricálcico, de aluminio y hierro. Aliyat y colaboradores (2022), reportaron solubilización en las 3 fuentes de fosfatos, siendo la mayor en fosfato tricálcico; mientras que, en aluminio y hierro fueron similares.

En el estudio de Nugraha y colaboradores (2019), se encontraron variaciones en la solubilización de fósforo para la cepa K3.1, en fosfato de aluminio y calcio, con concentraciones reportadas de 53.52 y 57.10 mg/L respectivamente; para el fosfato de hierro, la concentración fue de 4.20 mg/L.

Panda y colaboradores (2016), informaron intervalos de fósforo soluble en calcio entre 57.30 y 150.47 mg/L, para aluminio, de 28.50 a 61.30 mg/L. y para el de hierro de 58.60 a 103.40 mg/L.

Investigaciones adicionales, como la llevada a cabo por Abreu y colaboradores (2017), se limitaron exclusivamente al empleo de fosfato de calcio como fuente de fósforo, con resultados que revelaron concentraciones de fósforo soluble entre 111.35 y 174.5 mg/L.

Con base en los datos exhibidos en la Tabla 2, se dispone de más información sobre la solubilización de las tres fuentes de fosfatos en comparación con el medio sólido. Se observan variaciones en los niveles de solubilidad, siendo evidente que la solubilización es más pronunciada en presencia de fosfato de calcio en comparación con fosfatos de aluminio y hierro. Lo cual presenta un campo de investigación para la solubilización de fosfato de aluminio y hierro

Tabla 2. Antecedentes de concentración de fósforo soluble en medio líquido.

Referencia	Bacteria solubilizadora de fósforo (BSF)	[P] mg/L		
		Fuente de P		
		AlPO ₄	FePO ₄	Ca ₃ (PO ₄) ₂
Aliyat <i>et al.</i> , 2022.	BM11	36.90	36.90	174.33
	BM28	70.26	70.26	159.48
	CB19	45.81	45.81	101.90
	CB13	37.52	37.52	158.72
	BT125	71.64	71.64	159.48
	BT3S171	41.85	41.85	117.51
	BN313	34.85	34.85	149.03
	BM218	51.96	51.96	129.93
	BM215	64.92	64.92	115.54
Nugraha <i>et al.</i> , 2019.	K3.1	53.52	4.20	57.10
	A1	1.70	5.50	6.30
	A4	4.60	63.45	57.70
	K3.3	6.30	53.60	58.60
Abreu <i>et al.</i> , 2017.	1915			114.19
	1916			174.52
	1917			150.47
	1918.			111.35

	M14	40.00	70.30	150.10
	M61	45.60	78.20	151.00
Panda <i>et al.</i> ,	M510	61.30	103.40	139.90
2016.	C22	28.50	64.00	57.30
	R42	39.00	58.60	92.90

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Fósforo en el suelo

El fósforo (P) es un elemento que se encuentra presente en diversos tipos de suelos, con concentraciones que oscilan entre 100 y 3000 mg P/kg. Proviene principalmente de depósitos de roca fosfórica, de origen sedimentario y complejos ígneos alcalinos ricos en apatito (Coordinación General de Minería, 2014). Estas liberan el P a través de mineralización, meteorización, lixiviación, y o erosión. Las plantas son capaces de absorberlo y sintetizarlo en forma de fosfato, para su uso en reacciones bioquímicas como la fotosíntesis, respiración celular, fijación de nitrógeno, transporte de nutrientes, obtención de energía y muchas más (Khan *et al.*, 2010). Cabe destacar que ningún elemento puede suplir las funciones del P, por ello es tan imprescindible su aprovechamiento, sobre todo en las primeras etapas del crecimiento en una planta.

Las formas de fósforo que se encuentran en el suelo se dividen en inorgánico (Pi) y orgánico (Po). El fósforo orgánico proviene de desechos vegetales, animales, y la degradación microbiana; mayormente son ácidos nucleicos, fosfolípidos, y proteínas (Acízar *et al.*, 2012). Puede conformar un 50 % del P insoluble total del suelo y se encuentra comúnmente en forma de fosfatos de inositol y ésteres de fosfato.

Las formas inorgánicas se encuentran comúnmente fijadas en formas de fosfatos insolubles, lo cual conlleva a su acumulación en suelos ácidos y alcalinos, dependiendo de los iones, de manera que el ion H_2PO_4^- se encuentra en suelos ácidos, y el HPO_4^- en suelos alcalinos. También se pueden encontrar en forma de sales, ya sea cristalinas, absorbidas por los coloides del suelo o en solución (Sanzan, 2001).

3.1.1 Abundancia y disponibilidad del fósforo en suelo

La abundancia del P en el suelo es en promedio 600 mg/ kg^{-1} y sus reservas se encuentran principalmente en forma insoluble (Bashan *et al.*, 2013). Dado que es un recurso no renovable (Lambers *et al.*, 2006), se estima que dichas reservas disminuirán considerablemente para el año 2040, e incluso las reservas mundiales conocidas de roca fosfórica de alta calidad pueden agotarse en el siglo actual.

Un exceso de fósforo en el suelo puede interferir en la absorción de otros nutrientes como manganeso, hierro y zinc, así como desplazar el propio fósforo y afectar la absorción de molibdeno, un elemento traza. Este exceso puede provocar toxicidad y una coloración amarilla en las hojas (Álvarez, 2019). Por otro lado, la deficiencia de P en el suelo ocasiona aumento en el crecimiento de las raíces de las plantas en busca de fuentes solubles de fósforo. Cuando no se encuentran, esto resulta en un crecimiento insuficiente y un retraso en la maduración de la planta (Álvarez, 2019).

La disponibilidad del fósforo es un tema crucial en suelos agrícolas, ya que, a pesar de encontrarse en altas cantidades, su inmovilización, mineralización, meteorización o estar en disolución lo hace inaccesible para las plantas. El aprovechamiento del P se ve afectado por diversos factores como la vegetación, el tipo y uso del suelo, la precipitación, el riego, la humedad y la temperatura (Ancizar *et al.*, 2012). Por ello, es esencial garantizar una alta disponibilidad de P para mantener un rendimiento óptimo en los cultivos.

La disponibilidad del fósforo inorgánico es baja, dada la complejidad de solubilizar los fosfatos y que se obtengan índices de solubilización altos. El P_i se clasifica en tres grupos distintos, cada uno con su respectiva disponibilidad. La primera de ellas es la soluble. El P_i soluble es aprovechado inmediatamente por las plantas, el cual es de baja concentración en los suelos, de 0.2 a 0.5 mg/L (Barančíková *et al.*, 2007).

Este se encuentra en forma de ortofosfatos, ya sea monobásicos (H_2PO_4^-) o dibásicos (HPO_4^{2-}) (Banerjee *et al.*, 2010).

Otra forma de fósforo es el intercambiable que es de baja disponibilidad, dado que su proceso de asimilación por las plantas es lento. Un factor importante en este tipo de Pi es el pH, donde en suelos ácidos, puede ser absorbido por óxidos de hierro y aluminio o por óxidos de calcio en suelos alcalinos (Sanzan, 2001). La tercera forma es la más común y abundante del fósforo, el P insoluble. Teniendo como resultado su precipitación en compuestos fosfatados, debido a que el P se encuentra unido fuertemente a iones como Ca^{2+} , el Fe^{3+} o el Al^{3+} (Ho, 2012).

3.1.2 Ciclaje de Fósforo

La productividad de un sistema se mide por la disponibilidad de los nutrientes, en el caso del P, debido a la baja disponibilidad, la competencia entre los seres vivos se intensifica. El ciclaje del P en el suelo, como se muestra en la **Figura 1**, comienza con la descomposición del P contenido en restos de animales, humanos, bacterias, y restos de plantas. El Po obtenido pasa por el proceso de mineralización, que consiste en la conversión de fosfatos orgánicos a ortofosfatos (H_2PO_4 , H_3PO_4) que se encuentran en solución en el suelo (Picone *et al.*, 2002).

Los ortofosfatos pueden ser absorbidos por las plantas dada su solubilidad o adsorbidos por superficies como las arcillas u óxidos de aluminio y hierro. Cuando no es ni absorbido ni adsorbido se precipita como compuestos secundarios en forma de fosfatos insolubles o de baja solubilidad (Beltrán, 2014); es decir, los fosfatos inorgánicos se convierten a fuentes orgánicas no disponibles para el uso de las plantas, quedando el P inmovilizado.

En cuanto a procesos que impliquen la solubilización del P para su absorción por las plantas, son importantes la disolución de los fosfatos insolubles, la meteorización de minerales primarios y la desorción de superficies minerales, son esenciales (Beltrán, 2014).

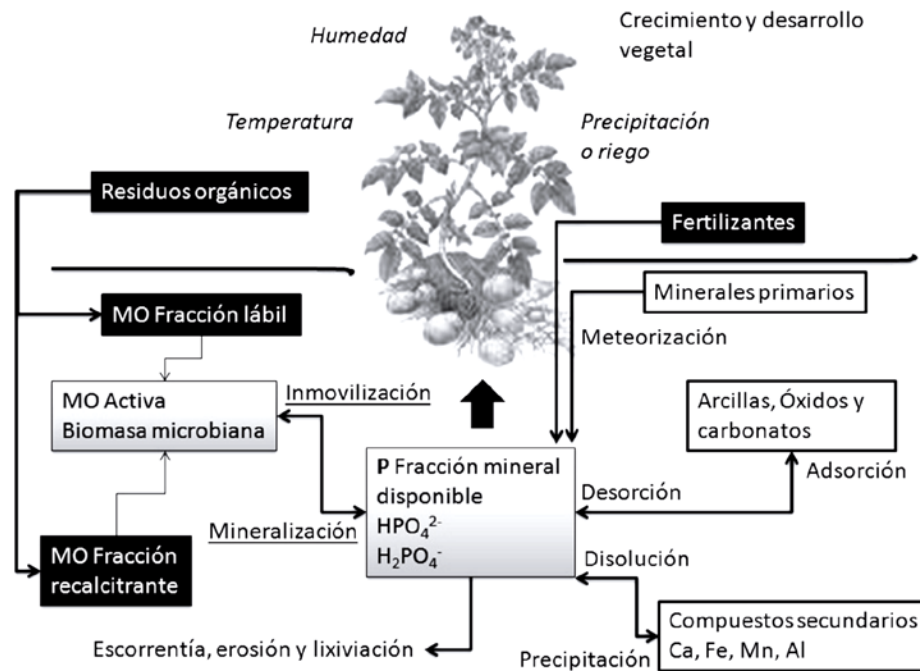


Figura 1. Relaciones entre el ciclo del fósforo y los compartimientos orgánicos y minerales. Los cuadros negros son las entradas al sistema, los grises las fracciones disponibles, sin color las fracciones minerales; sin recuadro factores que tienen influencia en la disponibilidad de P. **Fuente:** Picone & Zamuner (2002).

3.1.3 Fosfato de aluminio y hierro en el suelo

La **Figura 2** ilustra la precipitación del fósforo inorgánico en compuestos fosfatados insolubles, comúnmente encontrados en formas tales como fosfato de aluminio y hierro (Ancízar *et al.*, 2012). El origen de estos fosfatos viene de la formación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, entre algunos ejemplos están el ácido

butírico, oxálico, succínico y málico. Estos provocan la acidificación del suelo, lo cual resulta en la quelación de iones metálicos de Fe^{3+} y Al^{3+} (Plazas, 2007).

El fosfato de aluminio puede formar sales insolubles cuando el fosfato de la lluvia entra en contacto con el aluminio disuelto en el suelo. Este se une a elementos esenciales como lo son el nitrógeno y el potasio. Cabe destacar que este ortofosfato es tóxico por lo que deben tomarse precauciones al trabajar con él (Meza & Munera, 2014).

La formación del fosfato de hierro se ve favorecido en zonas con temporadas de sequias mientras que, el mal drenaje favorece al fosfato de aluminio. Su formación también puede ser causada debido al uso excesivos de fertilizantes de naturaleza química, mayormente en suelos rojos y los derivados de cenizas volcánicas. Estos suelos cuentan con una gran capacidad de inmovilizar grandes cantidades de fósforo, es por ello por lo que se encuentran en grandes cantidades. Los fertilizantes suplementan el fósforo en el suelo, pero con el paso del tiempo, el P se vuelve insoluble (Banerjee *et al.*, 2010).

La solubilidad de estos fosfatos es menor que el fosfato tricálcico, donde le sigue el fosfato de aluminio y en menor solubilidad el fosfato de hierro. Esto hace imprescindible el uso de bacterias solubilizadoras de P, con mecanismos solubilizadores de fósforo como las rizobacterias (Pan & Cai, 2023).

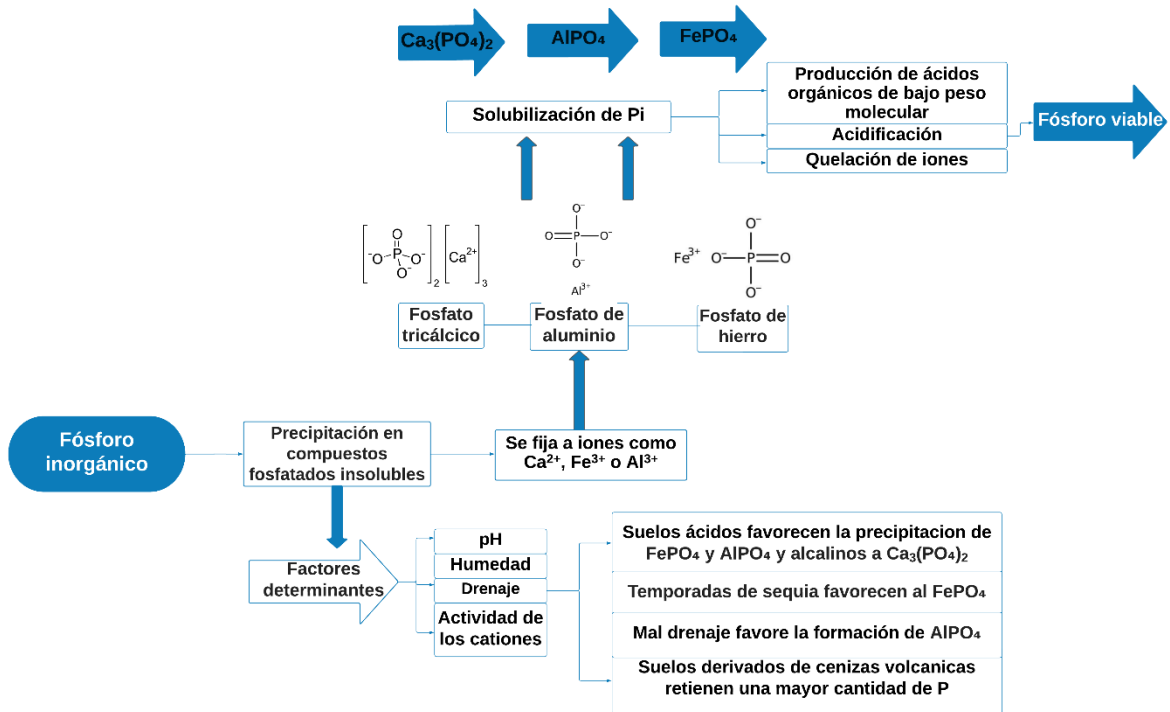


Figura 2. El fósforo inorgánico y su precipitación en compuestos fosfatados insolubles. **Fuente:** Meza & Munera (2014).

3.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Las bacterias representan una alternativa para una agricultura sostenible, ya que ofrecen múltiples beneficios a la planta, como lo es potenciar el crecimiento, principalmente el de las raíces (enraizamiento) para aumentar el tamaño de superficie. Cuando las bacterias colonizan las raíces de las plantas, el pH del suelo disminuye, aumenta la actividad microbiana y se presentan cambios redox, favoreciendo la liberación de ácidos orgánicos, los cuales son parte importante en el proceso solubilización de las BPCV (Bashan *et al.*, 2014).

Esto genera un mayor aprovechamiento de nutrientes, por lo que se mejora la disponibilidad, así como la absorción de minerales y compuestos fosfatados

(Benjumeda, 2017). Es por ello que la creciente importancia de las BPCV implica un análisis exhaustivo, ya que no solo contribuyen al crecimiento de las plantas, sino que también brindan protección contra patógenos, reduciendo costos y riesgos en los cultivos.

3.2.1 Definición y actividades de las BPCV

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) son definidas como microorganismos que se encuentran colonizando la rizosfera de las plantas.

Exhiben diversas funciones beneficiosas (**Figura 3**), como lo son la producción de IAA, ACC deaminasa y etileno, la solubilización de fósforo, y la liberación de elementos traza como hierro y zinc. Además, desempeñan un papel crucial como agentes de biocontrol, particularmente mediante la liberación de agentes antifúngicos que inducen la síntesis de fitoalexinas, activando así mecanismos de defensa contra bacterias y hongos (Sharma *et al.*, 2013). Estas bacterias también contribuyen a la fijación de nitrógeno, un elemento vital para el desarrollo y la supervivencia de las plantas (Sharma *et al.*, 2013).

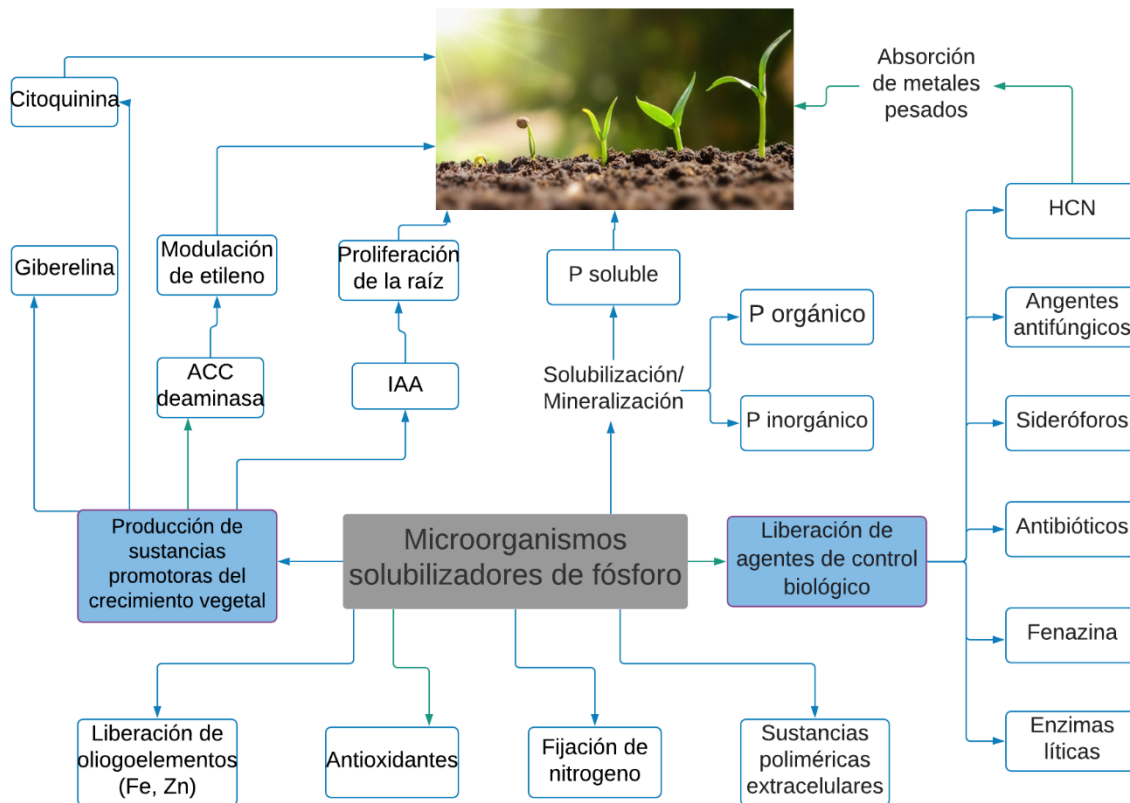


Figura 3. Actividades metabólicas realizadas por los microorganismos promotores del crecimiento vegetal. **Fuente:** Sharma *et al.* (2013).

3.2.2 Selección de las BPCV

Se han identificado diversos géneros capaces de solubilizar fosfatos, de los cuales los más destacados son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pantoea* y *Erwinia*. Estas pueden ser aisladas de casi cualquier localidad edafoclimática, las cuales muestran actividad solubilizadora en escala de laboratorio y campo (Sánchez *et al.*, 2012).

En la literatura, numerosos trabajos informan el aislamiento de especies bacterianas autóctonas como potenciales solubilizadoras de fósforo, demostrando sus capacidades en experimentos in vitro a través de la determinación del índice de solubilización (IS) (Restrepo *et al.*, 2015; Cisneros *et al.*, 2017). La efectividad de las bacterias solubilizadoras de fósforo depende de la capacidad de los aislados para colonizar la rizosfera y mantener su actividad biológica. El adecuado desempeño de las BPCV está influenciado por factores tales como el pH, la salinidad y la temperatura (Restrepo *et al.*, 2015).

Es por ello que es muy importante realizar una adecuada selección de las cepas de BSF para lograr productos eficientes cuando sean aplicados en campo. Para el aislamiento de las mismas, existen opciones de donde obtener las muestras, como muestras de suelo, raíces y rizosfera. Los medios de cultivo, como el medio agar Pikovskaya (PKV) y el medio NBRIP (Medio de Crecimiento para Fosfatos del Instituto Nacional de Investigación Botánica) son los más utilizados debido a su eficiencia para seleccionar bacterias con alta capacidad para solubilizar fuentes de fósforo inorgánico (Yu *et al.*, 2011).

3.2.3 Interacción BPCV-planta

La mayoría de las BPCV favorecen el crecimiento vegetal por mecanismos directos como solubilización de nutrientes, fijación de nitrógeno, producción de reguladores del crecimiento, entre otros., o por mecanismos indirectos como estimulación del desarrollo de micorrizas, exclusión competitiva de patógenos o eliminación de sustancias fitotóxicas.

Las plantas en la rizosfera comprenden interacciones raíz-raíz, raíz-insecto y raíz-microorganismo. Según Cardoso y Freitas (1992), las comunidades microbianas de la rizosfera están fuertemente asociadas con el ciclo biogeoquímico de nutrientes

como C, P, N y S, la eliminación de toxinas y la producción de fitohormonas o antibióticos. Asimismo, muchas rizobacterias aprovechan los productos del metabolismo que otros microorganismos generan de los exudados vegetales. Por lo tanto, la rizosfera ha aparecido como un entorno ecológico versátil y dinámico de intensas interacciones planta-microorganismo que aprovecha los micro y macronutrientes esenciales que intervienen en el crecimiento de las plantas.

Las rizobacterias no patógenas para la planta tienen la capacidad de antagonizar a los patógenos mediante la producción de antibióticos y la secreción de enzimas líticas. Estas actividades son particularmente importantes en la rizosfera, donde los hongos patógenos son atraídos por las raíces de las plantas; sin embargo, las rizobacterias reducen la actividad de los microorganismos patógenos no solo a través del antagonismo microbiano, sino también activando a la planta para que se defienda mejor (Camarena *et al.*, 2007). Este fenómeno, es denominado Resistencia Sistémica Inducida (RSI).

3.2.4 Solubilización de fósforo por bacterias promotoras del crecimiento vegetal

La solubilización del fósforo a través de bacterias solubilizadoras de P (BSF) es una alternativa contra los fertilizantes químicos, que además de implicar costos adicionales, a largo plazo reducen la fertilidad del suelo, afectan la diversidad microbiana y solo 30% es realmente utilizado (Banerjee *et al.*, 2010). Lo demás es fijado en formas insolubles como lo son los fosfatos de aluminio, hierro o calcio (Achal *et al.*, 2007).

Las BSF son una parte fundamental en el ciclaje del P, representan del 1-50% de la población total del suelo y desempeñan diversas funciones, como lo son la

conversión de Pi a Po, y viceversa. Esto con el propósito que el fósforo se encuentre en una forma viable para facilitar la absorción por las raíces de las plantas (Sharma *et al.*, 2013).

La solubilización de P es un factor de calidad en la promoción del crecimiento vegetal, dado que el fósforo es un elemento primario en un cultivo; es decir, es necesario para que su reproducción y maduración sea óptima (Sharma *et al.*, 2013).

3.3 Solubilización de fósforo

3.3.1 Mecanismo bioquímico de solubilización de P

Los mecanismos de solubilización se dividen en dos principalmente, los de fósforo inorgánico (Pi) y los de fósforo orgánico (Po) (**Figura 4**). Entre los mecanismos de Pi se encuentra la producción de ácidos orgánicos que puede ocurrir ya sea por cambio en el pH, producción de sustancias quelantes, competencia por unión a sitios de P, o formando complejos solubles a través de la liberación de iones metálicos de Al, Fe, y Ca (Vyas & Gulati, 2009; Sharma *et al.*, 2013).

En cuanto al metabolismo de las BSF, estas producen ácidos orgánicos a través de la respiración oxidativa o como producto de la fermentación. Esto resulta en la quelación de aniones metálicos unidos a P o también se puede dar la asimilación directa de fosfatos insolubles acumulados en las células (García, 2017).

Cuando el pH del suelo es ácido, abunda el ion H_2PO_4 , pero conforme aumenta el pH este se encuentra en las formas HPO_4 y HPO_4^{-2} . Para su solubilización por BSF se requiere de la sustitución del ion H^+ lo cual resulta en liberación de ácidos orgánicos. En casos como el fosfato de aluminio se ha demostrado su solubilización

a través de la quelación de Al por medio de HCl y ácido glucónico (Whitelaw *et al.*, 1999).

Otro mecanismo presente ocurre cuando se da la producción de H₂S, que reacciona con el fosfato de hierro, para la liberación del P. Otro mecanismo es la asimilación de NH₄⁺ por medio de la liberación de protones (Sharma *et al.*, 2013).

Los mecanismos de solubilización de Po, se basan en el proceso de mineralización, el cual consiste en la conversión de compuestos orgánicos de P a formas inorgánicas como los fosfatos (Khan *et al.*, 2009; Tapia & García, 2013). Se da principalmente por enzimas hidrolíticas extracelulares como las fosfatasas y las fitasas, que han ido adquiriendo interés, dada su aplicación biotecnológica para mejoramiento de cultivos agrícolas (Tapia & García, 2013).

Las fosfatasas son un tipo de enzima producida naturalmente por microorganismos, catalizan la hidrólisis del enlace éster en el fosfato orgánico, liberando un ion ortofosfato y dejando disponible un grupo hidroxilo del grupo fosfato. Existen diversos tipos, de los cuales destacan las fosfatasas ácidas y alcalinas que actúan a un pH de 4 a 9 y aumentan la disponibilidad de P (Arévalo *et al.*, 2014).

Otro tipo de enzima son las fitasas, estas son producidas principalmente por bacterias como *Bacillus sp*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *E. coli* (Álvaro, 2019). Llevan a cabo la hidrólisis de un enlace éster encontrado en compuestos como hexafosfato de inositol. Dejando en forma soluble al fósforo para su asimilación por parte de las plantas (Arévalo *et al.*, 2014).

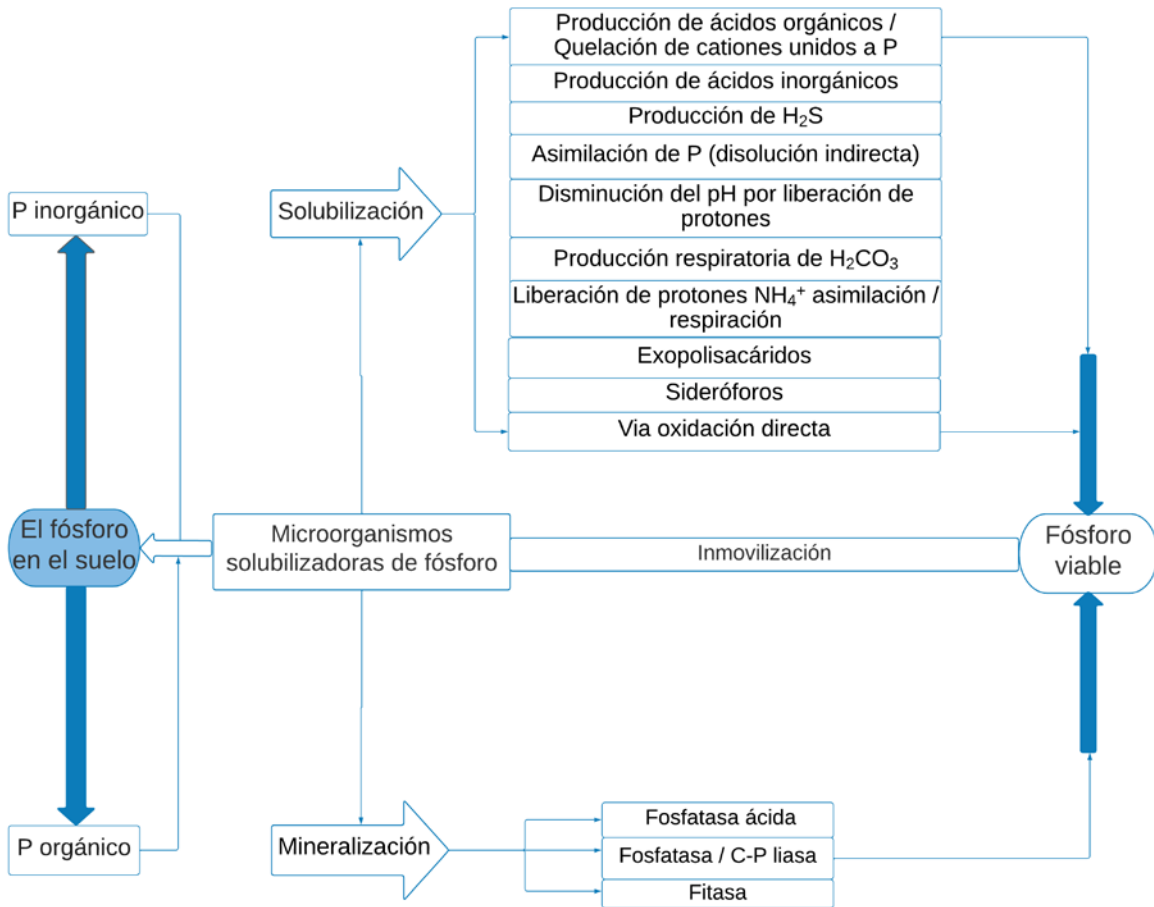


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de solubilización, mineralización e inmovilización del P del suelo. **Fuente:** Sharma *et al.* (2013).

3.3.2 Método de índice de solubilización en medio sólido

El índice de solubilización es una expresión numérica que relaciona las cantidades del diámetro del halo formado y el diámetro de la colonia bacteriana.

El método consiste en aislar la cepa bacteriana por medio de disoluciones seriadas con agua destilada estéril, por cada disolución se siembra en medio agar Pikovskaya (PKV), y se incuban las muestras durante una semana a la temperatura de 27°C; posteriormente, se lleva a cabo la purificación por resiembras en el mismo

medio, utilizando como fuente de fósforo fosfato tricálcico, fosfato de aluminio o fosfato de hierro (Cisneros y Sánchez, 2015).

Tras una incubación adicional de 7 días a la misma temperatura, se realizan mediciones para cuantificar el índice de solubilización. Estas mediciones buscan determinar el diámetro del halo formado alrededor de la colonia, indicativo del proceso de solubilización (**Figura 5**), así como el diámetro de la colonia bacteriana (Cisneros *et al.*, 2017).



Figura 5. Halo de solubilización formado por *P. lilacinus* en medio sólido con fosfato tricálcico a los 10 días. **Fuente:** Sharma *et al.* (2013).

3.3.3 Método espectrofotométrico de molibdato de amonio

La reacción entre los iones de fósforo y una solución ácida que contiene iones de molibdeno y antimonio da como resultado la formación de un complejo de antimonio-fosmolibdato. La reducción posterior de este complejo usando ácido ascórbico conduce al desarrollo de un complejo azul distintivo, caracterizado por una fuerte coloración de molibdeno. La cuantificación de la concentración de ortofosfato se logra midiendo el grado de absorción de este complejo (Severiche & Gonzalez, 2012).

Los polifosfatos, así como ciertos compuestos organofosforados, pueden evaluarse sometiéndolos a hidrólisis con ácido sulfúrico, que los convierte en ortofosfatos que posteriormente reaccionan con molibdato (Severiche & Gonzalez, 2012).

Para evaluar la solubilización en medio líquido Pikovskaya con su fuente de P (fosfato de aluminio y hierro), se incuban las cepas bacterianas a 48°C por 48 horas a 120 rpm. Seguido se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C, y se recupera al sobrenadante. Este se vierte (100 µL) en tubos junto con 4.2 mL del destilado y 500 µL de molibdato de amonio y se deja en un agitador a 150 rpm (Kumari *et al.*, 2018). Este reacciona en condiciones ácidas con ortofosfatos para formar molibdovanadato en presencia de vanadio, obteniendo como resultado un color amarillo correspondiente al ácido vandomolibosfórico.

La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de fosfato de la muestra. Este método puede medir cantidades de fósforo de 32.6 mg/L a 100 mg/L como fosfato (Cisneros y Sánchez, 2015).

4. JUSTIFICACIÓN

Sólo 0.1% del fósforo del suelo es soluble por ello, los gastos por agroquímicos son cada vez mayores. Las consecuencias de su uso excesivo se comprueban en la fertilidad del suelo en el transcurso de los años siguientes, ya sea por reacciones químicas del P, su absorción, precipitación, e inmovilización microbiana. Debido a la precipitación del P en fosfatos insolubles como lo son los de calcio, aluminio y hierro (Plazas, 2007).

El fósforo en un cultivo es un factor determinante de la calidad; es decir, es un nutriente primario que, en cantidades adecuadas, garantizará el crecimiento correcto y maduración más temprana de las plantas (Sharma *et al.*, 2013).

Es por ello, que los biofertilizantes hechos a base de bacterias solubilizadoras de fósforo representan una alternativa para la agricultura sostenible a través de la solubilización del P y la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Lambers *et al.*, 2006).

En el contexto de los biofertilizantes, la capacidad de solubilizar diversas fuentes de fósforo, incluidos el fosfato de aluminio y hierro, imparte un mayor grado de adaptabilidad y ventaja competitiva. Esta adaptabilidad depende de la preservación de su capacidad de solubilización inherente, lo que les brinda la capacidad de prosperar en condiciones ambientales adversas.

Esto significaría un paso en la dirección correcta hacia mejorar la agricultura mexicana ante las necesidades alimenticias de una población creciente. Así como presentar alternativas sostenibles y responsables ante la retención de fósforo en este tipo de suelos (Marks, 2019) con el fin de garantizar una seguridad alimentaria y una nutrición mejorada para las generaciones futuras.

5. HIPÓTESIS

En ensayos realizados bajo condiciones *in vitro* (agar y medio líquido PKV), las cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato mostrarán diferencias en su eficiencia para solubilizar tres fuentes insolubles de fosfato (calcio, hierro y aluminio).

6. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la eficiencia de bacterias solubilizadoras de fosfatos en la solubilización de fosfato de calcio, hierro y aluminio mediante ensayos *in vitro* para valorar su uso potencial como biofertilizante.

Objetivos particulares

Evaluar el crecimiento de cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos en medio PKV.

Determinar el índice de solubilización de fosfatos de calcio aluminio y hierro en cinco cepas bacterianas crecidas en medio sólido Pikovskaya.

Evaluar la capacidad solubilizadora de cepas bacterianas con fosfato de aluminio y hierro mediante cinéticas en medio líquido.

7. MATERIALES Y METÓDOS

7.1 Origen del cepario

Se trabajó con 5 cepas bacterianas previamente aisladas del suelo de cultivos de papa en el área del nevado de Toluca. Las cuales solubilizan fosfatos en medio sólido y líquido PKV (Aguilar-Rivera, 2020) y que pertenecen al cepario del laboratorio de Exploración de la Microbiología del Suelo en el Centro de Investigación en Recursos Bióticos de la Facultad de Ciencias, UAEMEX.

7.2 Reactivación del cepario en agar nutritivo

Para preservar y mantener las cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos se llevó a cabo su reactivación en medio nuevo. Para la cual se prepararon 276 mL de agar nutritivo en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se especifica su composición en la Tabla 3. Se calentó en una parrilla con agitación constante hasta su ebullición, una vez disuelto, se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión por 15 minutos, a una temperatura de 121°C.

Se dejó enfriar y se distribuyó equitativamente en 7 cajas Petri correspondientes a las 5 cepas bacterianas nativas, 1 cepa comercial: *Bacillus subtilis* y un control negativo sin biomasa. Durante 24 horas se mantuvieron en refrigeración para su completa solidificación y al día siguiente por medio de la técnica de estriado se sembraron las 6 cepas bacterianas. Se incubaron por 24 horas a 28°C, se muestran los resultados de crecimiento en la **Figura 6**.



Figura 6. Reactivación del cepario en agar nutritivo después de 24 horas de incubación.
Fuente: elaboración propia.

Tabla 3. Composición de medio agar nutritivo

Composición	Concentración (g/L)
Agar microbiológico	15
Peptona caseína	3
Extracto de levadura	5
Cloruro de calcio	0.1
Glucosa	10

7.3 Producción de inóculo en caldo nutritivo

A partir de las cepas previamente reactivadas en agar nutritivo, se recogió asépticamente una muestra de biomasa modesta pero adecuada mediante técnicas microbiológicas. Posteriormente, para cada cepa bacteriana, se introdujo el inóculo en tubos de cultivo separados, cada uno de los cuales contenía 8 mL de caldo nutritivo previamente preparado y esterilizado. La composición del caldo se especifica en la Tabla 3 (sin agar microbiológico). Estos se incubaron a 28°C durante un período de 12 horas para facilitar la proliferación de la biomasa (**Figura 7**).

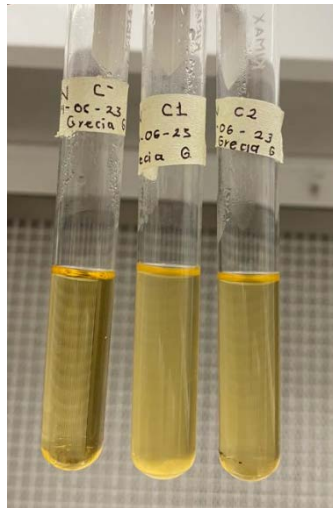


Figura 7. Producción de inóculo en caldo nutritivo después de 12 horas de incubación.

Fuente: Elaboración propia.

7.4 Cosecha de biomasa por centrifugación

La suspensión de caldo nutritivo se centrifugó durante 20 minutos a 3,500 rpm para sedimentar las células bacterianas. Se decantó el sobrenadante y la biomasa se resuspendió en tubos de cultivo con solución salina estéril al 0.85% en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar.

7.5 Ajuste de biomasa por densidad óptica

Se extrajo un volumen de 1 mL de la suspensión celular anterior y se introdujo en una celda espectrofotométrica para estandarizar la cuantificación de la biomasa. Este ajuste se basó en la obtención de mediciones de absorbancia de 0.2 unidades utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda específica (λ) de 600 nanómetros.

7.6 Prueba de índice de solubilización en agar Pikovskaya

Una vez ajustada la biomasa, se tomó un volumen de 10 μ L del tubo de cultivo mediante una micropipeta y posteriormente se inoculó en agar Pikovskaya (PKV). Este fue previamente preparado de acuerdo con las especificaciones detalladas en la Tabla 4 para cada una de las fuentes de fósforo; fosfato tricálcico, fosfato de aluminio y fosfato de hierro (Cisneros y Sánchez, 2015). Este procedimiento de inoculación se repitió cuatro veces dentro de la misma placa de Petri y se realizó por triplicado.

Posteriormente las cajas de Petri se incubaron durante un período de una semana a una temperatura de 28°C. Las mediciones tanto del diámetro del halo alrededor de las cepas como del diámetro de la colonia se registraron en intervalos de 24 horas. Estas mediciones se realizaron para evaluar el índice de solubilización, siguiendo la metodología descrita por Cisneros *et al.* (2017).

Se obtuvo el índice de solubilización a partir de la fórmula siguiente:

$$ISP = \frac{\text{Diámetro de halo formado} + \text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

Tabla 4. Composición de medio agar Pikovskaya

Composición	Concentración (g/L)
Agar microbiológico	15.00
Sulfato de amonio	0.50
Cloruro de potasio	0.70
Sulfato de magnesio	0.10
Glucosa	10.0
Extracto de levadura	0.50
Fosfato tricálcico	3.00
Fosfato de aluminio	3.00
Fosfato de hierro	3.00

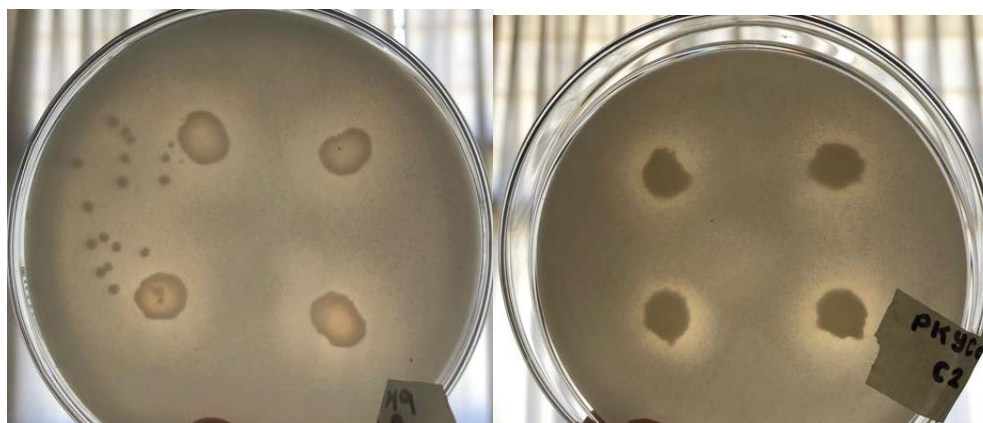


Figura 8. Halos de solubilización al día 8 de incubación.

Fuente: elaboración propia

Para un cálculo más específico de ISP se tomaron evidencias fotográficas de los halos de solubilización (**Figura 8**).

Utilizando el programa de procesamiento digital de fotos ImageJ se llevó a cabo una calibración de estas imágenes por medio de la barra de ImageJ se seleccionó la

herramienta línea recta (straight line) y se dibujó una línea entre dos marcas de la escala, en este caso primeramente se dibuja la línea abarcando el diámetro de la caja petri (**Figura 9**).

Pulsando Ctrl + m se muestra una ventana con la longitud en pixeles, en el que se introduce un valor en distance (distancia) en pixeles y en known distance (distancia conocida) que representa la distancia conocida de la escala. Una vez establecida la escala, se utiliza la herramienta línea recta para medir el diámetro de la colonia, seguido del diámetro del halo de solubilización y se procede a utilizar la fórmula para el cálculo de ISP. Se abre cada imagen con el programa y se precede a realizar el mismo paso, ya conservada la calibración (Alarcón, s.f).

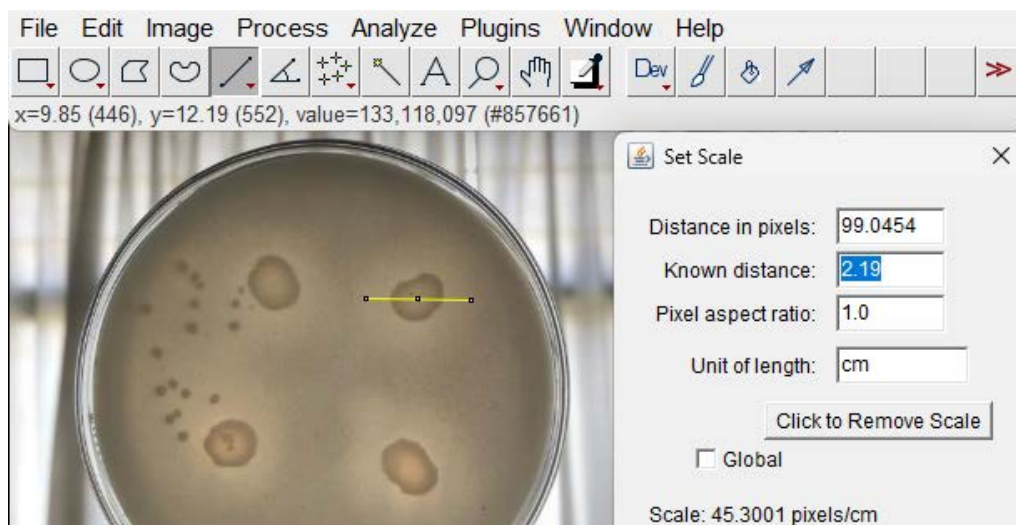


Figura 9. Representación esquemática de la medición de halos de solubilización y colonias bacterianas al día 8 de incubación en el programa ImageJ.

Fuente: elaboración propia.

7.7 Cuantificación de fósforo soluble por el método azul de molibdeno en medio líquido

Se realizó la determinación de fósforo soluble a través del método espectrofotométrico de molibdato de amonio de acuerdo a PROY-NMX-AA-029/1-SCFI-2008 con algunas modificaciones. El material de cristalería utilizado se lavó con jabón libre de fosfatos, una vez seco, se metió por 2 días en un recipiente que contenía una disolución de ácido clorhídrico (2.5 M) y se enjuagó con agua destilada para eliminar residuos de fósforo presentes en las paredes de vidrio.

Se preparó una solución de 0.1 L de ácido ascórbico 0.56 M, una solución de 1 L de ácido sulfúrico 9 M. La solución de molibdato ácido se preparó a partir de dos disoluciones previamente hechas: (1) 13 g de heptamolibdato amónico tetrahidratado diluidos en 0.1 L de agua, (2) 0.35 g de tartrato de antimonio y potasio diluidos en 0.1 L de agua. La disolución (1) fue agregada en 0.3 L de solución de ácido sulfúrico 9 M; se agregó posteriormente la disolución (2) en el mismo matraz y se agitó constantemente. La solución ácida de molibdato fue conservada en refrigeración en un recipiente de vidrio color ámbar (Diario Oficial de la Federación, 2023).

Se preparó medio líquido PKV y se sembraron las cepas con mayores índices de solubilización previamente aisladas del proceso de selección cualitativo en agar PKV y se incubaron por 8 días. Se tomó 1 mL de cada tubo y se sometieron al mismo tratamiento del método de ácido ascórbico: 1 mL muestra + 1 mL de ácido ascórbico (0.56 M) + 200 μ L de solución molibdato ácido. Se midió la absorbancia en un espectrómetro a 880 nm con celdas de 1.0 cm de longitud de paso óptico.

A partir de estas lecturas, se utilizó una curva de calibración de fosfatos previamente realizada, fue calculada la concentración en mg/L de ortofosfatos de los días 0, 4 y 8. Así mismo, se midió el pH y la absorbancia a 600 nm para la medición de biomasa. Esto se realizó por cuadruplicado.

7.8 Diseño experimental

Se empleó un diseño de bloques aleatorizados, donde los bloques representaron los tiempos de observación, especificados como el día 4 y el día 8. Los tratamientos se refieren a las diferentes cepas bacterianas evaluadas, que incluyen C1, C2, C3, C5, C6 y *Bacillus subtilis*. Se realizaron 12 repeticiones para cada combinación de cepa y tiempo.

En la segunda etapa experimental se utilizó un diseño de bloques aleatorizados, con los bloques representando los tiempos de observación (día 4 y 8) y los tratamientos como las cepas bacterianas evaluadas (C1, C2, C3 y *Bacillus subtilis*). Se llevaron a cabo 4 repeticiones para cada combinación de cepa y tiempo.

7.9 Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA para un diseño en bloques completamente aleatorios y una prueba de Tukey HSD para detectar diferencias significativas entre las variables medidas según la cepa utilizada. Además, se llevó a cabo una prueba t de Student para comparar los tiempos de medición. Estas pruebas fueron realizadas con un nivel de confianza del 95% utilizando el software Statgraphics Centurion 19.6.03.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Crecimiento de BSF y presencia de halo de solubilización

En la **Figura 10** se muestran fotografías representativas del crecimiento de colonias bacterianas de la cepa comercial *Bacillus subtilis* en agar PKV con cada una de las fuentes insolubles de fósforo. De manera similar, las BSF demostraron capacidad de crecimiento al utilizar calcio, aluminio y hierro como fuentes de fósforo. Lo que sugiere su potencial adaptabilidad y versatilidad metabólica en la solubilización de fosfatos en diferentes condiciones ambientales (Iftikhar *et al.*, 2024).

Las colonias exhiben una forma circular y definida, siendo caracterizadas de tamaño grande ya que alcanzan aproximadamente 1 cm de diámetro. La variación en el color de las colonias es influenciada por las condiciones específicas del medio de cultivo, presentando coloraciones desde blanco hasta tonalidades beige y ligeramente amarillentas. La textura se describe como lisa y opaca, destacando una superficie homogénea. Es relevante señalar que no se evidenció elevación en dichas colonias, lo cual constituye un aspecto distintivo de su fenotipo de la cepa *Bacillus subtilis* que concuerda con lo descrito por De la Maza (2020).

Las cepas bacterianas se identificaron molecularmente previamente mediante el análisis del gen ribosomal 16S. Se observó que las cepas C1, C2 y C5 exhiben similitudes significativas con especies pertenecientes al género *Pseudomonas sp.*, específicamente al *Pseudomonas libanensis*. Por otro lado, las cepas C3 y C6 tienen similitudes con el género *Bacillus sp.*, identificándose la cepa C3 como *Bacillus pumilus* y la cepa C6 como *Bacillus siamensis* de acuerdo con Sánchez y colaboradores (2022).

Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son reconocidos por su capacidad para solubilizar fósforo. En estudios recientes, se ha reportado que actúan como promotores del crecimiento vegetal y de la productividad agrícola; además, algunas cepas de estos géneros también pueden exhibir propiedades antagonistas contra patógenos vegetales y promover el crecimiento de las plantas mediante la producción de fitohormonas y otros compuestos beneficiosos (Okazaki *et al.*, 2019; Kour *et al.*, 2020).

Todas las cepas bacterianas estudiadas presentaron halo de solubilización o zona clara alrededor de la colonia, al utilizar como fuente de P al fosfato tricálcico. Cuando las cepas bacterianas se sembraron en fosfato de aluminio y hierro, no se detectaron halos de solubilización visibles en ninguna de las cepas como lo reportado por Islam y colaboradores (2007).

En la **Tabla 5** se reporta un resumen del crecimiento y formación de halo de solubilización. Las cepas C1, C2, C3 y *Bacillus subtilis*, crecieron y produjeron halo de solubilización abundante en fosfato tricálcico, mientras que las cepas C5 y C6 produjeron un halo de solubilización menor.

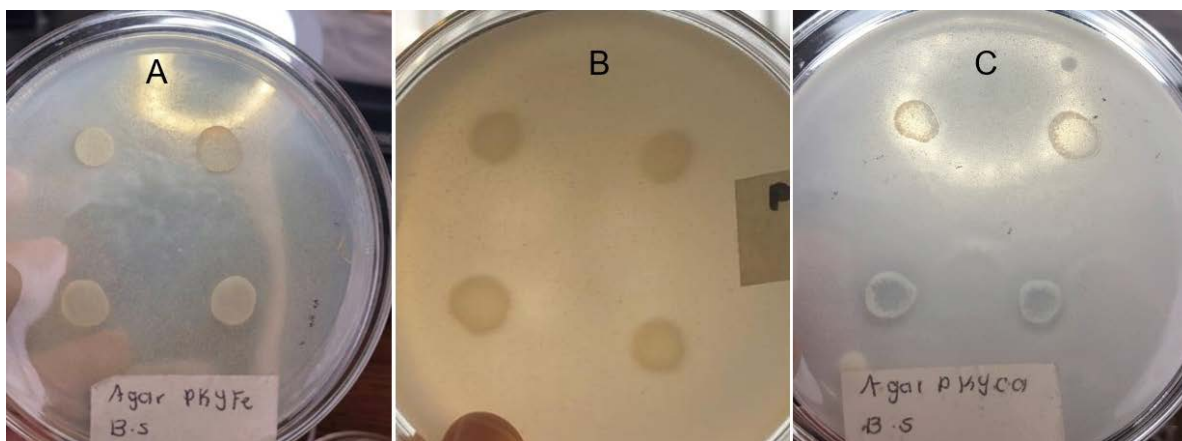


Figura 10. Crecimiento de biomasa después de 8 días de incubación. A: Fosfato de hierro. B: Fosfato de aluminio. C: Fosfato tricálcico.s

Tabla 5. Crecimiento y detección de halo de solubilización en las cepas bacterianas en medio agar Pikovskaya después de 8 días de incubación.

Cepa	Ca	Al	Fe
1	°°	+	+
2	°°	+	+
3	°°	+	+
5	°	+	+
6	°	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	°°	+	+
Control	-	-	-

Nota: + crecimiento, - No hay crecimiento, ° crecimiento + halo de solubilización, °° crecimiento + halo de solubilización abundante.

8.2 Índices de solubilización en agar Pikovskaya

En la **Figura 11** se reportan los valores de índices de solubilización de fósforo (ISP) en medio PKV con fosfato tricálcico para las BSF. El ISP constituye un parámetro semicuantitativo que evalúa la capacidad de una cepa para solubilizar una fuente de fósforo. Este exhibe variaciones significativas entre diferentes aislados bacterianos, oscilando en un intervalo que va desde 1.2 hasta 6.7 siendo estos valores observados a partir del tercer día (Mardad *et al.*, 2013).

Las BSF fueron capaces de solubilizar fosfato tricálcico *in vitro* en medio sólido. Los valores de ISP obtenidos fluctuaron entre 2.33 y 3.12 en el cuarto día, siendo este día el máximo punto de solubilización. Estos resultados se sitúan en un valor medio de solubilización, según la clasificación propuesta por Matos y colaboradores (2017).

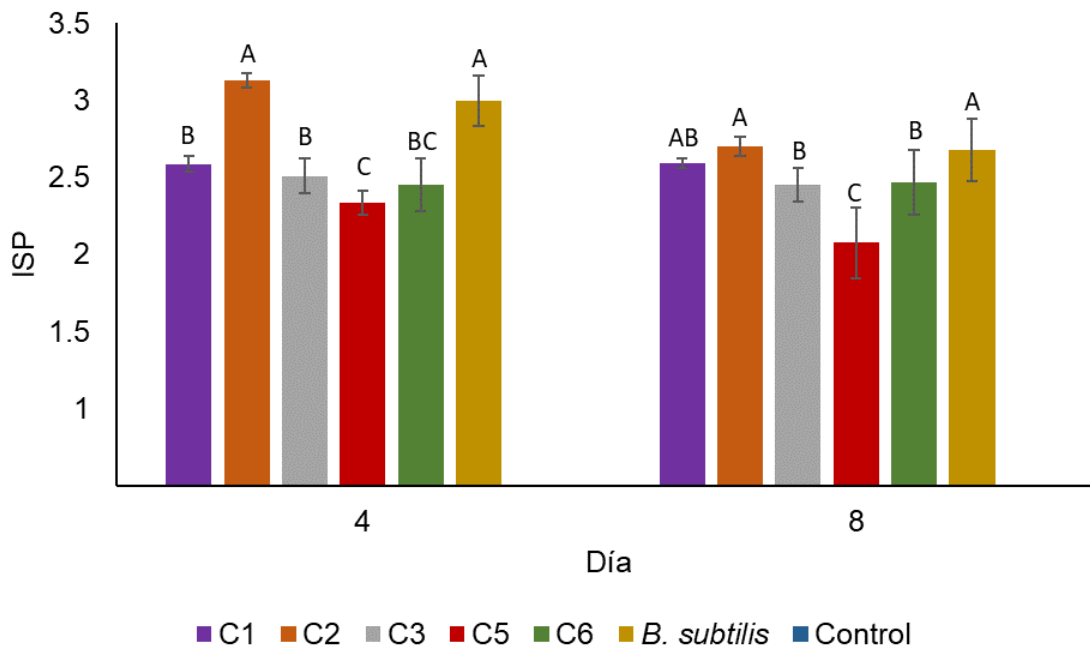


Figura 11. Índice de solubilización de fósforo en medio PKV $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a los 0, 4 y 8 días de incubación. Nota: Bacterias solubilizadoras de fósforo, Cepas C1, C2, C3, C5, C6, *Bacillus subtilis* y un control sin biomasa ($\bar{x} \pm$ desviación estándar). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$)

En el día 4 se observó que las cepas C2 y *Bacillus subtilis* presentaron el mayor ISP y significativamente diferente al encontrado en las demás cepas ($p < 0.05$). El orden de ISP fue C2 (3.12) > *Bacillus subtilis* (2.99) > C1 (2.58) > C3 (2.50) > C6 (2.45) > C5 (2.33).

En el octavo día también se observaron diferencias significativas en el ISP entre las cepas; ($p < 0.05$); de manera que, las cepas C2 (2.69) y *Bacillus subtilis* (2.67) exhibieron la mayor capacidad de solubilización de fósforo, seguidas por C1 (2.59). Las cepas C6 (2.46) y C3 (2.45) mostraron valores similares, mientras que la cepa C5 presentó la menor solubilización (2.07).

Al comparar el ISP entre los dos tiempos en la misma cepa, se observó que las cepas C2, C5 y *Bacillus subtilis* mostraron diferencias significativas entre el cuarto y octavo día, siendo más alta en el cuarto día ($p < 0.05$). Para las cepas C1, C3 y C6, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Estas variaciones en el ISP pueden indicar diferentes capacidades de las cepas para solubilizar fosfato, así como la posible influencia del tiempo de cultivo en dicho proceso.

La cepa C2 muestra una solubilización de fosfato significativamente mayor en comparación con las otras cepas nativas ($p < 0.05$). Sin embargo, es relevante observar la disminución del ISP al octavo día. Además, en comparación con los valores reportados por otros autores, la cepa C2 tiene ISP más altos que los informados por Montanez y colaboradores (2019) y se encuentra dentro del rango de los valores reportados por Aliyat y colaboradores (2022), que identificaron cuatro géneros de bacterias: *Pseudomonas*, *Serratia*, *Pantoea* y *Enterobacter*.

Las cepas evaluadas no mostraron ISP en fosfato de aluminio y hierro, donde la ausencia de halos en medio sólido PKV no indica de manera concluyente la falta de capacidad para solubilizar fósforo. Esto puede deberse a la insensibilidad de los medios para detectar la actividad solubilizadora, por lo que se requieren de técnicas más precisas como en medio líquido (Jones *et al.*, 1991; Whitelaw, 1999 Hernández *et al.*, 2011).

Dada la capacidad de solubilizar P inorgánico por la cepa C2 se seleccionó para pruebas adicionales junto con las cepas C1, C3 y *Bacillus subtilis*. Estas pruebas se centraron en la cuantificación de fósforo soluble.

8.3 Cinéticas de solubilización de fósforo en medio líquido

8.3.1 Fósforo soluble en medio líquido PKV

Debido a la ausencia de valores de ISP en fosfato de aluminio y hierro como lo reportado por Aliyat y colaboradores (2022) e Islam y colaboradores (2007), se recurrió al empleo del método de molibdato de amonio con el propósito de determinar su capacidad de solubilizar fósforo en medio líquido.

La **Figura 12** representa la concentración de fósforo soluble utilizando fosfato de aluminio como fuente de fósforo. Se observan diferencias significativas en la solubilización del aluminio al cuarto día de incubación de las cepas ($p < 0.05$). La cepa que exhibió la concentración más elevada de fósforo ($[PO]$ mg/L) fue la cepa comercial *Bacillus subtilis* (0.20 mg/L). Entre las BSF, la cepa C2 (0.075) mostró la máxima capacidad de solubilización seguido por la cepa C1 (0.073 mg/L) y la cepa C3 (0.018 mg/L).

Para el período de incubación del octavo día, los resultados revelaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la solubilización de fósforo. Se observó un ligero aumento en la concentración de P soluble en todas las cepas. La mayor cantidad se registró en *Bacillus subtilis* (0.21 mg/L), seguida por las cepas C2 (0.10 mg/L), C1 (0.08 mg/L) y C3 (0.03 mg/L).

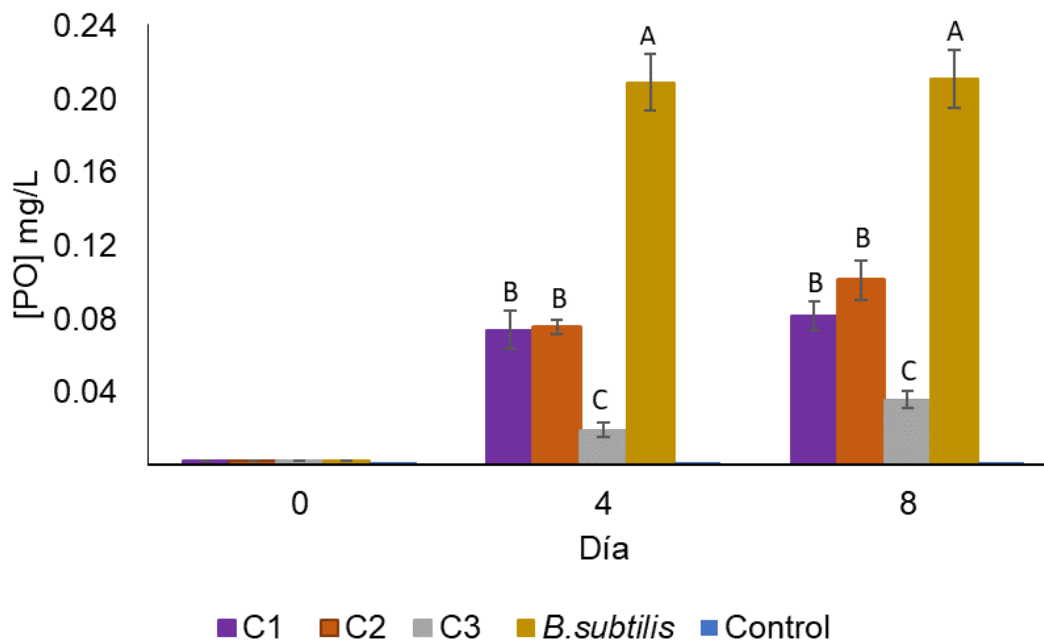


Figura 12. Solubilización de fósforo en medio PKV con AlPO_4 a los 0, 4 y 8 días de incubación. Nota: Bacterias solubilizadoras de fósforo, Cepas C1, C2, C3, *Bacillus subtilis* y un control sin biomasa ($\bar{x} \pm \text{desviación estándar}$). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$)

Aliyat y colaboradores (2022), reportaron solubilización de AlPO_4 con concentraciones de fósforo que varían entre 36.9 a 71.6 mg/L. Existe diversidad en datos de solubilización de AlPO_4 , Nugraha y colaboradores (2019), reportaron una concentración de P de 1.7 mg/L. Es evidente que hay discrepancia entre los valores obtenidos en el presente estudio y los resultados previamente publicados, lo que refleja que la eficiencia de solubilización está en función del metabolismo de la cepa bacteriana, así como las condiciones de cultivo (Lim *et al.*, 2007; Nugraha *et al.*, 2019).

La **Figura 13** ilustra la variación en la concentración de fósforo utilizando fosfato de hierro como fuente de P. No se observaron diferencias significativas en la concentración [PO] mg/L ($p > 0.05$), entre la cepa C2 (0.23 mg/L) y *Bacillus subtilis*

(0.21 mg/L), así como entre C1 y C3 (0.19 mg/L). Las concentraciones observadas son inferiores a las informadas por Nugraha y colaboradores (2019), así como a las registradas por Panda y colaboradores (2016). Esto puede ser debido a la selectividad del método empleado, así como interferencias químicas, reacciones secundarias o inestabilidad del P soluble.

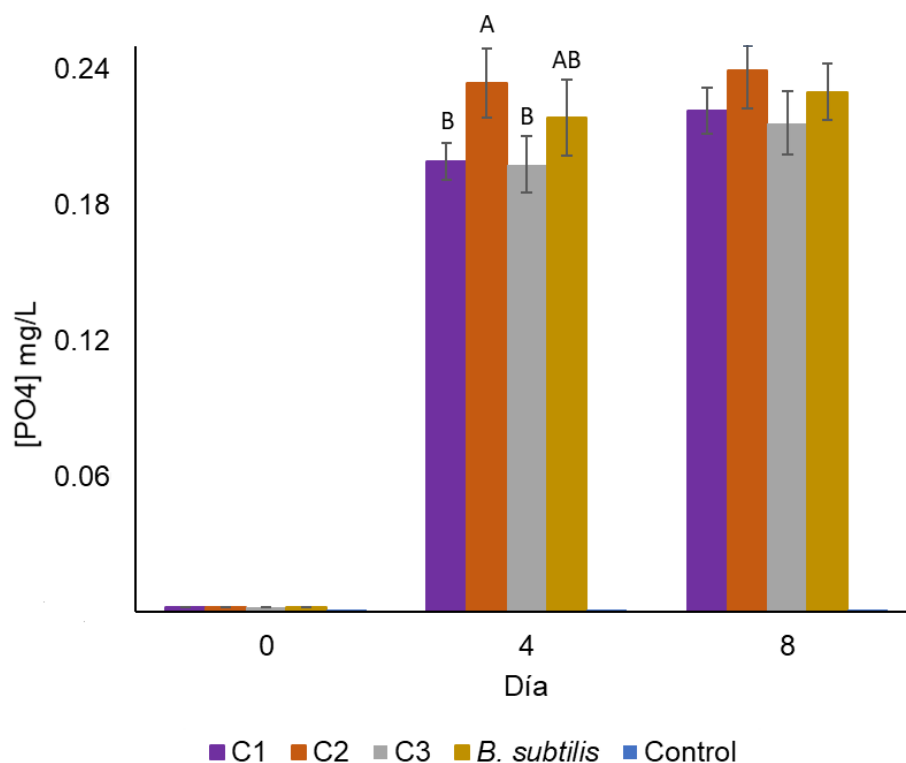


Figura 13. Solubilización de fósforo en medio PKV con FePO_4 a los 0, 4 y 8 días de incubación. Nota: Bacterias solubilizadoras de fósforo, Cepas C1, C2, C3, *Bacillus subtilis* y un control sin biomasa ($\bar{x} \pm$ desviación estándar). Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$)

En resumen, la variabilidad en las concentraciones de fósforo soluble evidencia la complejidad de los procesos de su solubilización por las BSP. La disparidad en las concentraciones podría atribuirse a divergencias en las condiciones de cultivo, tales

como el pH del medio, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura (Shen *et al.*, 2011).

La baja solubilización puede ser atribuida a la mayor complejidad estructural de estos fosfatos, los cuales exhiben una menor solubilidad en comparación con el fosfato de calcio. Debido a la mayor estabilidad de los complejos formados entre cationes metálicos como Al y Fe y los fosfatos, se dificulta la solubilización por parte de las BSF como lo descrito por Aliyat y colaboradoras (2022).

Pese a las bajas concentraciones de fósforo soluble en las cepas analizadas, es notable que la solubilización fue más pronunciada con fosfato de hierro que con aluminio. Donde incluso concentraciones en apariencia modestas podrían ejercer impactos significativos en procesos biogeoquímicos y, por ende, en el desarrollo de las plantas como lo reportado por Vargas y colaboradores (2019).

8.3.2 Comportamiento de pH en las cinéticas de solubilización de P en medio líquido PKV

En la **Figura 14** se muestran los cambios de pH en el medio de aluminio (PKV) en diferentes días de incubación. En general, el pH disminuyó con el tiempo para todas las cepas bacterianas y *Bacillus subtilis*. Esto sugiere que estas cepas están produciendo compuestos que hacen que el medio se vuelva más ácido. Por otro lado, el control sin biomasa no experimentó cambios significativos en su pH, manteniéndose estable en 5.2.

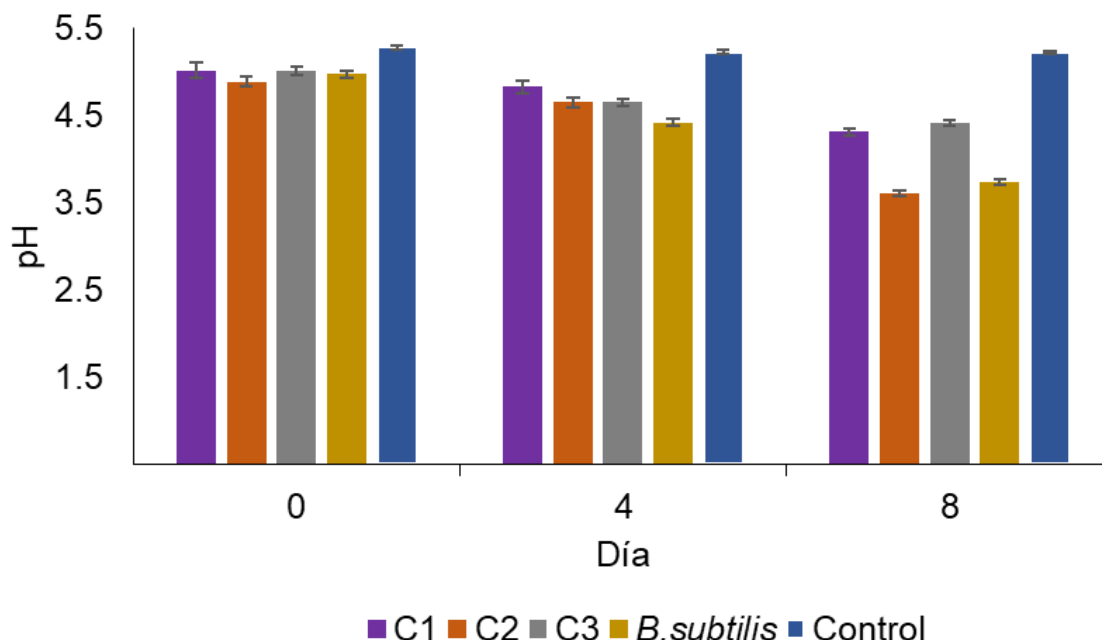


Figura 14. pH en el medio PKV con AlPO_4 y cepas bacterias solubilizadoras de fósforo, C1, C2, C3, *Bacillus subtilis* y control sin biomasa ($\bar{x} \pm$ desviación estándar).

La disminución del pH puede deberse a la producción de ácidos orgánicos por las BSF como lo son el ácido acético, cítrico, fórmico, oxálico y fórmico, entre otros (Benbrik *et al.*, 2020). Los ácidos orgánicos generados por las bacterias disuelven fosfato insoluble con una disminución del pH, quelación de cationes e interacción con el fosfato en los sitios de absorción en el suelo. Así, los ácidos orgánicos producidos por el metabolismo de BSF forman complejos estables con Ca^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} lo que resulta en la quelación de cationes y, por lo tanto, el aumento de la solubilidad del P (Nahas, 2006; Anand *et al.*, 2013).

Los valores reportados corresponden a niveles ácidos, se mantienen en el rango de lo reportado por Aliyat y colaboradores (2022), en el que obtuvieron intervalos de pH de 3.3 a 4.0 en fosfato de aluminio.

En la **Figura 15** se reporta el pH del medio PKV de hierro en distintos períodos de incubación. El pH inicial promedio fue de 4.9 en el día cero. Las cepas C1, C2 y *Bacillus subtilis* disminuyeron el pH a 3.5 el octavo día. En contraste, la cepa C3 mantuvo un pH constante de 4.6 en el experimento.

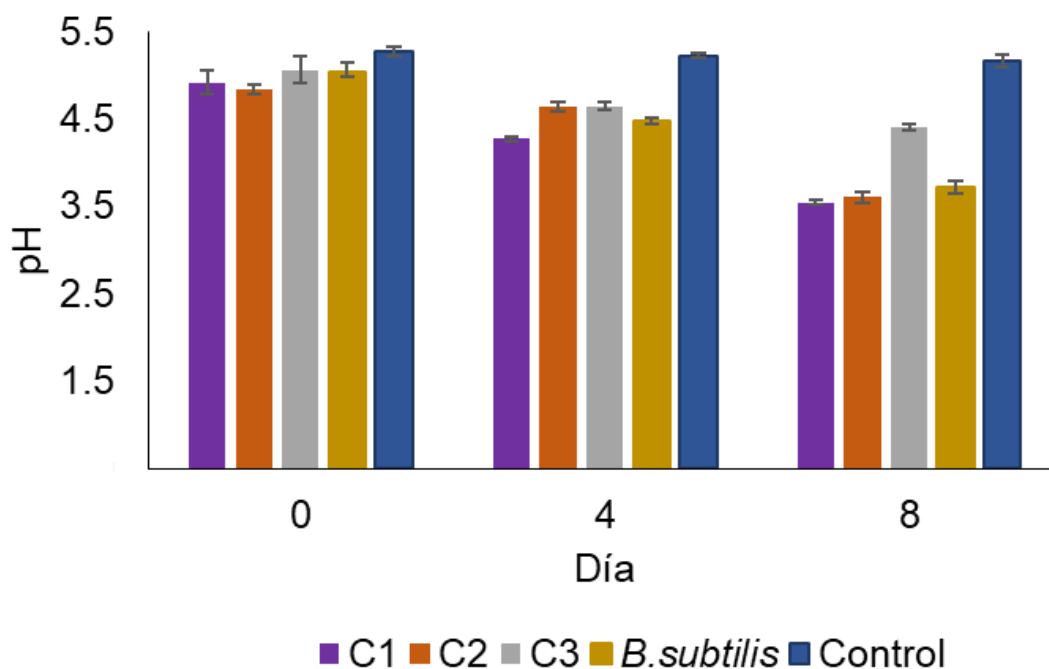


Figura 15. pH en el medio PKV con FePO_4 y cepas de bacterias solubilizadoras de fósforo, C1, C2, C3, *Bacillus subtilis* y control sin biomasa ($\bar{x} \pm$ desviación estándar).

El pH se mantuvo dentro del rango reportado por Sánchez y colaboradores (2022), 3.45 a 3.50. Estos valores de pH pueden afectar la solubilización del fósforo; se ha observado una disminución en la solubilidad cuando el pH desciende a 4.5 y 3.5. Es importante destacar que la acidificación del medio es uno de los principales mecanismos de solubilización (Marra *et al.*, 2015). A pesar de que una acidificación excesiva del medio puede tener repercusiones negativas en la actividad biológica de solubilización de fósforo, un pH moderadamente ácido es fundamental para este proceso.

8.3.3 Monitoreo de biomasa en cinéticas de solubilización de P en medio líquido PKV

La **Figura 16** muestra el crecimiento de la biomasa en el medio PKV con aluminio durante el período de incubación. La biomasa de todas las cepas se estandarizó el día 0 para asegurar condiciones de crecimiento uniformes. Se observa un crecimiento exponencial hasta el día 4, seguido de una fase estacionaria en los días siguientes. Destaca que la cepa comercial *Bacillus subtilis* y cepa C2 exhibieron el mayor crecimiento, señalando posibles diferencias en la capacidad de crecimiento entre cepas. Además, se considera que la disponibilidad de nutrientes podría haber sido un factor limitante en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano (Shen *et al.*, 2011; Sánchez-González *et al.*, 2022).

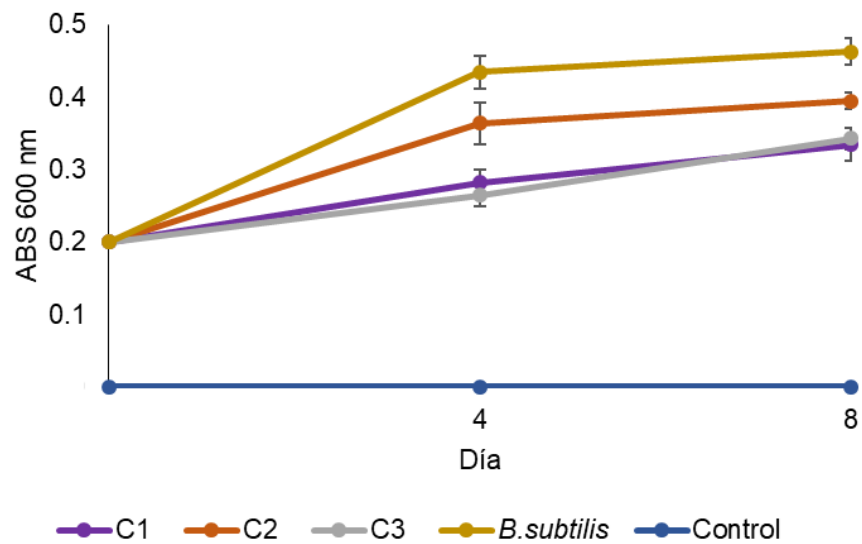


Figura 16. Cuantificación por densidad óptica de la biomasa de las cepas bacterianas solubilizadoras de fósforo, C1, C2, C3, *Bacillus subtilis* y control sin biomasa, cultivadas en medio PKV con AlPO_4 ($\bar{x} \pm$ desviación estándar).

La **Figura 17** presenta el crecimiento de la biomasa en el medio PKV con fosfato de hierro durante el período de incubación. Al igual que con fosfato de aluminio presentó una cinética de crecimiento estándar que describe el patrón típico de aumento en la población de microorganismos a lo largo del tiempo de incubación. Se destaca que la cepa comercial *Bacillus subtilis* y C2 exhibieron el mayor crecimiento. Además, se observa uniformidad en el crecimiento en presencia de hierro en comparación con aluminio, con *Bacillus subtilis* y C2 en un grupo, y las cepas C1 y C3 en otro. Esto sugiere posibles diferencias en la capacidad de crecimiento entre cepas bajo diferentes condiciones en el medio (Sánchez-González *et al.*, 2022).

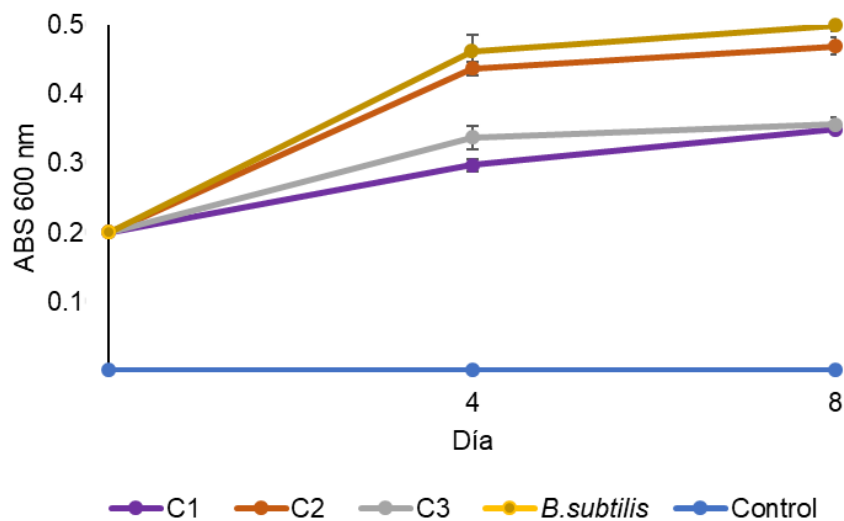


Figura 17. Cuantificación por densidad óptica de la biomasa de las cepas bacterianas solubilizadoras de fósforo, C1, C2, C3, *Bacillus subtilis* y control sin biomasa, cultivadas en medio PKV con FePO_4 ($\bar{x} \pm$ desviación estándar).

9. CONCLUSIONES

Las cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos C1, C2 y C5 relacionadas con el género *Pseudomonas*, y C3 y C6 relacionadas con el género *Bacillus*, son capaces de crecer y solubilizar fosfatos en medio PKV utilizando como fuente de P al calcio, aluminio y hierro.

La eficiencia de las cinco cepas de bacterias para la solubilización de tres fuentes insolubles de fosfato, fue con base en el siguiente orden: calcio > hierro > aluminio.

El ISP evaluado en fosfato de hierro y aluminio no resultó efectivo. Las cepas bacterianas utilizadas podrían no estar adaptadas o ser sensibles a las condiciones específicas de fosfato de hierro y aluminio empleadas en el medio de cultivo.

La capacidad solubilizadora fue mayor en presencia de fosfato de hierro en comparación con el fosfato de aluminio, entre las cepas analizadas, *Bacillus subtilis* y la cepa C2, mostraron una eficiencia en la solubilización de fósforo en condiciones ácidas.

La diversidad genética de las cepas bacterianas y las condiciones ambientales específicas son factores fundamentales por considerar al evaluar la capacidad solubilizadora de fósforo, un aspecto crítico para el desarrollo de biofertilizantes en la agricultura regenerativa.

Los resultados de esta investigación sugieren que la cepa bacteriana C2 (*Pseudomonas libanensis*) tiene potencial para su formulación como biofertilizante.

La capacidad de estas cepas para solubilizar diversas formas de fosfato inorgánico las posiciona como opciones atractivas para ser utilizadas como biofertilizantes. Se recomienda llevar a cabo investigaciones adicionales para evaluar si estas cepas pueden aumentar el rendimiento de los cultivos cuando son aplicadas.

10. REFERENCIAS

Abreu, C., Figueiredo, J., & Oliveira, C. (2017). Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genetics and Molecular Research*, 16(1). doi: 10.4238/gmr16019462.

Achal, V., Savant, V., & Reddy, M. (2007). Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubugensis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 695-699.

Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1–20. doi: 10.1016/j.jksus.2013.05.005.

Alarcón, B. (s.f). Primeros pasos en ImageJ: guía para descargar el programa, abrir una imagen, mejorarla, poner una barra de medida e imprimir. Servicio de Microscopía. Instituto de Biomedicina de Valencia. Recuperado de <https://www.ibv.csic.es/smicroscopia/Documentos/Primeros%20pasos%20en%20ImageJ.pdf>.

Aliyat, F. Z., Maldani, M., El Guilli, M., Nassiri, L., & Ibijbijen, J. (2022). Phosphate-Solubilizing Bacteria Isolated from Phosphate Solid Sludge and Their Ability to Solubilize Three Inorganic Phosphate Forms: Calcium, Iron, and Aluminum Phosphates. *Microorganisms*, 10(5), 980. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050980>.

Álvaro, G. (2019). El fósforo y su importancia en el crecimiento vegetal. Recuperado de <https://www.fertibox.net/single-post/fosforo-agricultura>.

Ancízar, F., Cerón, L., & Gutiérrez, A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285-295. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=776/77624081026>

Arévalo, Z., Corrales, L., Moreno, V., & Ramírez, M. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C., & Standing, D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. Isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science*, 4(6), 378-383.

BaranČíková, G., Liptaj, T., & Prónayová, N. (2007). Phosphorus fractions in arable and mountain soils and their humic acids. *Soil and Water Research*, 2(4), 141–148.

Barroso, C., & Nahas, E. (2008). Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43, 529–535.

Bashan, Y., De-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology-formulations and practical perspectives. *Plant and Soil*, 378, 1-33.

Bashan, Y., Kamnev, A. A., & De-Bashan, L. E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*, 49, 465-479.

Beck, C. (2010). *An Introduction to Plant Structure and Development*. New York: Cambridge University Press.

Beltrán, M. (2014). Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113.

Benbrik, B., Elabed, A., El Modafar, C., Douira, A., Amir, S., Filali-Maltouf, A., El Abed, S., El Gachtouli, N., Mohammed, I., & Koraichi, S. I. (2020). Reusing phosphate sludge enriched by phosphate solubilizing bacteria as biofertilizer: Growth promotion of *Zea mays*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101825.

Benjumeda, D. (2017). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. (Trabajo Fin de Grado Inédito). Universidad de Sevilla, Sevilla.

Bobadilla, C., & Rincón, S. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de composta obtenida de residuos de plaza. Colombia.

Cadena, J., Guzman, L., & Martinez, M. (2016). Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. Recuperado de

<https://www.researchgate.net/publication/298352046> APLICACION DE SECUENCIACION MASIVA PARA EL ESTUDIO Y EXPLORACION DE DIVERSIDAD MICROBIANA Y SU APROVECHAMIENTO BIOTECNOLOGICO.

Callejas, G., Cisneros, C., & Caicedo, L. (2018). Capacidad solubilizadora de fosfato de aluminio por hongos rizosféricos aislados de un andisol colombiano. *Entramado*, 14(2), 218-227. <http://dx.doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.2.4745>.

Cardoso, C., Costa, A., Guimarães, F., Soares, M., Souchie, E., & Vitorino, L. (2012). Solubilization of calcium and iron phosphate and in vitro production of Indoleacetic acid by Endophytic isolates of *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae). *International Research Journal of Biotechnology*, 3(4), 47-54.

Cisneros, C., & Sánchez, M. (2015). Solubilización de fosfatos por hongos asociados a un Andisol de tres agroecosistemas cafeteros de la región andina colombiana. *Ingenium*, 9(25), 37-46.

Cisneros, R., Menjívar, J., & Sánchez, M. (2017). Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos en un Andisol de la región cafetera colombiana. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6078247>.

Coordinación General de Minería. (2014). Perfil de mercado de la fosforita. Ciudad de México, México: Secretaría de Economía.

De la Maza, L. M., Pezzlo, M. T., Bittencourt, C. E., & Peterson, E. M. (2020). *Color Atlas of Medical Bacteriology* (pp. 54-61). American Society for Microbiology. DOI: [10.1128/9781683671077](https://doi.org/10.1128/9781683671077).

Dos Santos, J., Gomes, I., Gomes, W., Matos, A., Nietsche, S., Pereira, M., & Xavier, A. (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 2945-2954.

García Aguilar, M. Á. (2017). Identificación y caracterización de bacterias solubilizadoras de múltiples fuentes de fosfato inorgánico [Tesis de maestría, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato].

Gahoonia, T. S., Nielsen, N. E., Joshi, P. A., & Jahoor, A. (2001). A root hairless barley mutant for elucidating genetics of root hairs and phosphorus uptake. *Plant and Soil*, 235, 211-219.

Hernández-Leal, T. I., Carrión, G., & Heredia, G. (2011). Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, 45(8), 881-892. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000800003&lng=es&tlng=es.

Ho, Q. D. (2012). Assessing the situation of quantity and quality of properties of northern gray soil. *Journal of Agriculture and Rural Development*, Vol. 24.

Ibarra-Galeana, J. A., Castro-Martínez, C., Fierro-Coronado, R. A., *et al.* (2017). Characterization of phosphate-solubilizing bacteria exhibiting the potential for growth promotion and phosphorus nutrition improvement in maize (*Zea mays* L.) in calcareous soils of Sinaloa, Mexico. *Annals of Microbiology*, 67, 801–811. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1308-9>.

Iftikhar, A., Farooq, R., Akhtar, M., *et al.* (2024). Ecological and sustainable implications of phosphorous-solubilizing microorganisms in soil. *Discover Applied Science*, 6(33). <https://doi.org/10.1007/s42452-024-05683-x>

Inácio, A. C. F., Hara, F. A. d. S., Vendruscolo, J., Neto, P. d. Q. C., & Souza, L. C. C. d. (2020). Caracterização morfofisiológica de bactérias solubilizadoras de fosfatos provenientes da rizosfera de plantas alimentícias não convencionais /

Morphophysiological characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of non-conventional food plants. *Brazilian Journal of Development*, 6(5).

Islam, M. T., Deora, A., Hashidoko, Y., Rahman, A., Ito, T., & Tahara, S. (2007). Isolation and Identification of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizosphere of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(1-2), 103-110. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-1-218>.

Jones, D., Smith, B. F. L., Wilson, M. J., & Goodman, B. A. (1991). Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. *Mycological Research*, 95, 1090-1093.

Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56, 73–98.

Kirui, C. K., Njeru, E. M., Runo, S. (2022). Diversity and Phosphate Solubilization Efficiency of Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Semi-Arid Agroecosystems of Eastern Kenya. *Microbiology Insights*, 15. doi:10.1177/11786361221088991.

Kour, D., Rana, K. L., Sheikh, I., Kumar, V., Yadav, A. N., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2020). Alleviation of drought stress and plant growth promotion by *Pseudomonas libanensis* EU-LWNA-33, a drought-adaptive phosphorus-solubilizing bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, 785–795.

Kumari, P., Meena, M., Upadhyay, R. (2018). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from the rhizosphere of *Vigna radiata* (mung bean). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Doi - 10.1016/j.bcab.2018.07.029.

Lambers, H., Shane, M. W., Cramer, M. D., Pearse, S. J., & Veneklaas, E. J. (2006). Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany*, 98, 693-713.

Lim, B. L., Yeung, P., Cheng, C., & Hill, J. E. (2007). Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *ISME Journal*, 1, 321–330.

Mardad, I., Serrano, A., & 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*. Recuperado de <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/362824B20253>.

Marks, C. (2019). Detengamos la erosión del suelo para garantizar la seguridad alimentaria en el futuro. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado de <http://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1193735/>.

Marra LM, de Oliveira-Longatti SM, Soares CR, de Lima JM, Olivares FL, Moreira FM. (2015). Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 367-375. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246246220131102>.

Matos, A. D. M., Gomes, I. C. P., Nietzsche, S., Xavier, A. A., Gomes, W. S., dos Santos, J. A., & Pereira, M. C. T. (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*, 89(4), 2945–2954. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160111>.

Meza, I., & Munera, G. (2014). El fósforo elemento indispensable para la vida vegetal. Universidad Tecnológica de Pereira, Laboratorio de Análisis de Suelos.

Mohamed, A. E., Nessim, M. G., Abou-el-seoud, I. I., et al. (2019). Isolation and selection of highly effective phosphate-solubilizing bacterial strains to promote wheat growth in Egyptian calcareous soils. *Bulletin of the National Research Centre*, 43, 203. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0212-9>.

Nugraha, G. B. A., Wandri, R., & Asmono, D. (2019). Solubilisasi Fosfat Anorganik oleh Burkholderia spp. pada Rizosfer Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis Jacq.*) di Tanah Mineral Masam. *Jurnal Lahan Suboptimal*, 8(1), 86–93. doi: 10.33230/jlso.8.1.2019.404.

Okazaki, S., Sano, N., Yamada, T., Ishii, K., Kojima, K., Djedidi, S., Ramírez, M. D. A., Yuan, K., Kanekatsu, M., Ohkama-Ohtsu, N., & et al. (2019). Complete genome sequence of plant growth-promoting *Bacillus pumilus* TUAT1. *Microbiology Resource Announcements*, 8, 23–24.

- Pan, L., & Cai, B. (2023). Phosphate-Solubilizing Bacteria: Advances in Their Physiology, Molecular Mechanisms and Microbial Community Effects. *Microorganisms*, 11(12), 2904. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122904>
- Panda, B. H., Rahman, H., & Panda, J. (2016). Phosphate-solubilizing bacteria from the acidic soils of Eastern Himalayan region and their antagonistic effect on fungal pathogens. *Rhizosphere*, 2, 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.08.001>.
- Panhwar, Q. A., O. Radziah, M. Sariah, & M. R. Ismail. (2009). "Solubilization of Different Phosphate Forms by Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Aerobic Rice." *International Journal of Agriculture & Biology*, 11, 667–673.
- Pérez, H., Valencia, H., & Vera, D. (2002). Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de arazá (*Eugenia stipitata*, *Myrtaceae*). *Acta Biológica Colombiana*, 7, 33-40.
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*, 17, 362-370.
- Picone, L., & Zamuner, E. (2002). Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*, 16, 11-15.
- Plazas, E. C. (2007). Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras. Recuperado de <http://hdl.handle.net/20.500.12324/21707>.
- Prabhu, N., Borkar, S., & Garg, S. (2019). Phosphate solubilization by microorganisms: Overview, mechanisms, applications and advances. In S. N. Meena & M. M. Naik (Eds.), *Advances in Biological Science Research* (pp. 161-176). Academic Press. ISBN 9780128174975. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00011-2>.
- Punam, K., Meena, M., & Upadhyay, R. S. (2018). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from the rhizosphere of *Vigna radiata* (mung bean). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 155-162. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.029>.

Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 63-76.

Sánchez-González, M. E., Mora-Herrera, M. E., Wong-Villarreal, A., De La Portilla-López, N., Sánchez-Paz, L., Lugo, J., Vaca-Paulín, R., Del Águila, P., & Yañez-Ocampo, G. (2022). Effect of pH and Carbon Source on Phosphate Solubilization by Bacterial Strains in Pikovskaya Medium. *Microorganisms*, 11(1), 49. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010049>

Sánchez López, D. B., Gómez-Vargas, R. M., & Garrido Rubiano, M. F. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1401-1415.

Santillán, M. (2016). Así funcionan los biofertilizantes. UNAM. Recuperado de [http://ciencia.unam.mx/leer/570/Asi funcionan los biofertilizantes](http://ciencia.unam.mx/leer/570/Asi_funcionan_los_biofertilizantes).

Sanzan, A. (2001). El fósforo en el suelo. Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Recuperado de <https://www.edafologia.org/>.

Seminis. (2018). El Gran Potencial De La Industria Agrícola Mexicana. Recuperado de <https://www.seminis.mx/el-gran-potencial-de-la-industria-agricola-mexicana/>.

Severiche-Sierra, C., & Gonzalez-Garcia, H. (2012). Determinación de fosfatos en aguas por método colorimétrico: Validación de método. *Química Hoy Chemistry Sciences*, 2(3), 28-32. ISSN 2007-1183.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., & Trivedi, M. H. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.

Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W., & Zhang, F. (2011). Phosphorus dynamics: From soil to plant. *Plant Physiology*, 156, 997–1005. Principio del formulario.

Tapia-Torres, Y., & García-Oliva, F. (2013). La disponibilidad del fósforo es producto de la actividad bacteriana en el suelo en ecosistemas oligotróficos: Una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 31(3), 231-242. Recuperado el 8 de marzo de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792013000400231&lng=es&tlng=es.

Thakuria, D., Talukdar, N. C., Goswami, C., Hazarika, S., Boro, R. C., & Khan, M. R. (2004). Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science*, 86, 978–985.

Vargas-Barrante, P., & Castro-Barquero, L. (2019). Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo de Andisoles de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 43(1), 47-68. <https://dx.doi.org/10.15517/rac.v43i1.35649>.

Yu, X., Liu, X., Zhu, T. H., Liu, G. H., & Mao, C. (2011). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biology and Fertility of Soils*, 47, 437-446.

Whitelaw, M. A. (1999). Growth promoting of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy*, 69, 99-151.

Whitelaw, M. A., Harden, T. J., & Helyar, K. R. (1999). Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 31.