



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Efecto de la inoculación y coinoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo en la disponibilidad de fósforo en el suelo y en la tasa de germinación, crecimiento y desarrollo de *Solanum lycopersicum*

Tesis

Para obtener el título de:

Bióloga

Presenta

Dulce Andrea García Rivas

Directora de Tesis

Dra. Teresa González Ruiz

Los Reyes Iztacala, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
1. Introducción.....	3
2. Justificación.....	10
3. Pregunta de investigación	11
4. Hipótesis.....	11
5. Objetivos.....	11
6. Materiales y métodos.....	12
7. Resultados.....	21
8. Discusión.....	35
9. Conclusión.....	40
10. Bibliografía	41

Índice de figuras

Tabla 1	9
Tabla 2	12
Tabla 3	15
Tabla 4	17
Tabla 5	21
Tabla 6	34
Figura 1	13
Figura 2	14
Figura 3	17
Figura 4	19
Figura 5	20
Gráfica 1	22
Gráfica 2	23
Gráfica 3	24
Gráfica 4	25
Gráfica 5	26
Gráfica 6	27
Gráfica 7	28
Gráfica 8	29
Gráfica 9	30
Gráfica 10	32

Agradecimientos

Al Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza por las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Ecología Microbiana.

Esta tesis fue financiada con recursos de la UNAM, a través del Proyecto PAPPIT IN222618 “Diversidad y actividad biológica de actinobacterias del suelo de Zapotitlán: aislamiento, identificación y conservación de un banco de germoplasma”.

Resumen

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de todos los organismos. En los sistemas terrestres es un elemento limitante de la productividad primaria. Las bacterias solubilizadoras de fósforo actúan sobre los minerales y rocas fosfatadas, dejando disponible el fósforo inorgánico en la solución del suelo para que pueda ser utilizado por las plantas y otros microorganismos. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF) en inóculos puros y coinóculos sobre la germinación, crecimiento y biomasa de *Solanum lycopersicum* y sobre la disponibilidad de fósforo en el suelo. Se realizaron experimentos *in vitro* y en microcosmos con suelo a los cuales se les inocularon diferentes tratamientos de cultivos bacterianos puros y en coinóculo tomando como base dos cepas de *Streptomyces sp* (cepas 347 y 453) y dos UTO de morfología circular y consistencia cremosa (UTO 19 y 120). En experimentos *in vitro* que se llevaron a cabo en cajas Petri y se observaron durante una semana se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la longitud de la raíz con el cultivo puro de la UTO 120 y con la combinación de UTO 19+120. En experimentos en microcosmos con suelo, la disponibilidad de fósforo no mostró diferencias significativas a las siete semanas de crecimiento de *S. lycopersicum*, pero a las 14 semanas los tratamientos con las cepas 347 y 453, ambas del género *Streptomyces* y con la UTO 19, fueron estadísticamente mayores que el resto de los tratamientos. La combinación de resultados obtenidos con cada UTO o cepa inoculada ya sea de manera individual o en coinóculo sugieren que las bacterias y la planta se relacionan de manera diferente si se encuentran en condiciones *in vitro* o en el sistema suelo.

Palabras clave

Fósforo, solubilización de fósforo, *Streptomyces*, suelo, promoción del crecimiento vegetal

1. Introducción

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos debido a que forma parte de la composición de las moléculas necesarias para la vida. Dentro de sus principales funciones biológicas se encuentran la regulación enzimática, la señalización de proteínas (White et al, 2008), la acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular (Mendoza, 2003). El fósforo forma parte del ATP, que al hidrolizarse para formar ADP establece la base para las reacciones de transferencia de energía en los sistemas biológicos (Atlas y Bartha, 2002; Prada, 2013).

En las plantas, la importancia del fósforo radica en su participación sobre la fotosíntesis, la fijación simbiótica de nitrógeno, la floración y la fructificación (Antonio, 2015). La concentración adecuada de fósforo en el suelo aumenta el crecimiento de las raíces por lo cual éstas pueden extender el territorio de búsqueda de nutrientes y humedad. Ante una deficiencia de este elemento ocurrirá una desaceleración en el crecimiento y el desarrollo de la planta. La deficiencia se puede notar en los cambios en la arquitectura de la raíz y en la coloración del follaje que hace que las hojas jóvenes sean de color verde oscuro y las viejas de color púrpura debido a la formación excesiva de las antocianinas que se forman por la baja producción de azúcares. La carencia de fósforo también influye en el tiempo de cosecha lo que a su vez ocasiona una reducción en la producción agrícola, misma que se intenta subsanar con el uso de fertilizantes químicos fosforados (Fernández, 2005). En este contexto, el fósforo disponible es un importante factor limitante para las plantas, sólo después del nitrógeno y el agua (White et al, 2008).

El fósforo se encuentra en el suelo en forma de compuestos orgánicos e inorgánicos, formando parte de la biomasa de macro y microorganismos. En el suelo, las principales etapas del ciclo del fósforo involucran el paso por las plantas y su retorno a través de los residuos vegetales y animales, las reacciones de fijación en arcillas y óxidos y el recambio biológico por procesos de mineralización-inmovilización y solubilización llevados a cabo mediante la actividad microbiana (Stevenson y Cole, 1999). Estas interacciones con otros elementos influyen en su

disponibilidad y efectividad en la nutrición vegetal (Fernández, 2007). Normalmente los compuestos fosfatados no permanecen en el suelo ya que son impulsados por corrientes de agua hacia el mar, donde los organismos marinos los recirculan a través de la columna de agua, llevando una parte de nuevo a la superficie, mientras que otra permanece en forma de rocas fosfatadas (Vargas, 2012).

El ciclo del fósforo difiere de los otros ciclos biogeoquímicos en un aspecto fundamental que es la ausencia de compuestos volátiles, lo cual limita su capacidad de desplazamiento por el planeta. Se considera un ciclo cerrado o de sedimentación porque sus mayores reservorios o depósitos se encuentran en forma de rocas fosfóricas, en minerales como las apatitas ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$) e hidroxiapatitas ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) y en los depósitos de fosfato natural de donde es liberado a través de procesos de meteorización, lixiviación, erosión y extracción industrial (Cerón et al, 2012). El ciclo del fósforo es muy lento y una característica principal de sus reservorios es la insolubilidad de sus compuestos. Por ello, las plantas y otros organismos requieren de procesos de erosión que dejen expuestos los minerales y las rocas fosfatadas (Morales, 2012).

Junto con el proceso erosivo está la acción de ciertos microorganismos que tienen la capacidad para solubilizar el fósforo de los minerales y de las rocas fosfatadas y liberarlo a la solución del suelo. Esto permite que diversos microorganismos y plantas logren absorberlo e integrarlo a sus estructuras. El fósforo liberado paulatinamente de las apatitas es absorbido por las plantas y la biomasa microbiana, y cuando estos organismos mueren, la materia orgánica se convierte en un reservorio de este elemento. Durante el proceso de degradación, las enzimas fosfatasas de otros microorganismos actúan sobre los minerales y liberan de nuevo el fósforo al suelo, quedando así una parte biodisponible en el ecosistema, mientras que otra se reincorpora a los almacenes de materia orgánica de los suelos y sedimentos y nuevamente se deposita en forma de minerales poco solubles (Morales, 2012).

El fósforo orgánico (Po) no puede ser utilizado de manera directa por los organismos, y requiere de un proceso de transformación que lo lleve a formas

inorgánicas. La principal fuente de Po la constituyen los residuos de plantas, animales y microorganismos que liberan compuestos como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ésteres, lo que representa entre el 30-60% del P total. La mineralización de estos compuestos lo lleva nuevamente a fosfatos inorgánicos (HPO_4 y H_2PO_4) que pueden ser incorporados por la macro y microbiota autótrofa y heterótrofa (Cerón, 2012).

Se calcula que en el sistema suelo-planta, el 90% del fósforo está en el suelo, pero sólo una pequeña cantidad de éste se encuentra biodisponible. En los ecosistemas terrestres el contenido de fósforo generalmente varía entre 100 a 3000 mg/kg de suelo; y entre 15 a 80% se encuentra en formas orgánicas (Po). Esta cantidad depende de la naturaleza del material parental, del grado de precipitación, y de las pérdidas en la circulación dentro del sistema, entre otros factores (Fernández, 2007, Restrepo, 2014).

El fósforo inorgánico (Pi) generalmente se encuentra fijado en forma de fosfatos de Ca, Fe, Mg y Al, especialmente en las arcillas del grupo de las caolinitas y ocluido en los óxidos de hierro y aluminio. Incluso el fósforo aplicado como fertilizante puede volverse inutilizable debido a su inmovilización en la materia orgánica y en las arcillas (Cerón, 2012; Anzuay, 2015). En suelos alcalinos, los fosfatos son ocluidos principalmente en forma de fosfatos de calcio y magnesio, los cuales no pueden ser ocupados para la actividad biológica de manera directa. Las arcillas saturadas en calcio fijan más fósforo que las arcillas saturadas de sodio. De esta manera, la concentración de calcio en la solución del suelo es un factor determinante en la concentración de fósforo en el sistema edáfico. Otro aspecto importante es que la disponibilidad del Pi está fuertemente influenciada por el tipo de uso que se haga de este recurso y por el pH del suelo, ya que, a mayor pH, mayor fijación (Cerón, 2012).

Los suelos contienen una gran cantidad de micro y meso organismos entre los que se encuentran bacterias, hongos, colémbolos, algas, protozoos y nematodos. Para que un suelo sea naturalmente fértil, estos organismos deben liberar los nutrientes de la materia orgánica con la velocidad necesaria para que las plantas los puedan

incorporar a sus tejidos. Además, establecen diferentes tipos de asociaciones benéficas con las plantas a partir de las cuales se producen sustancias químicas que promueven su crecimiento aéreo y subterráneo y también combaten a otros organismos causantes de enfermedades (Julca et al, 2006).

En el ambiente suelo, los microorganismos se distribuyen en función de factores como la textura, el contenido de materia orgánica, el pH, la humedad, la disponibilidad de nutrientes y la concentración de oxígeno (Ramírez, 2009). Debido a la heterogeneidad del sistema edáfico, se presenta una regionalización natural que permite ubicar zonas de mayor o menor actividad biológica (Benjumeda, 2017).

La rizosfera se define como cualquier volumen de suelo influenciado por las raíces o en asociación con ellas y por todo el material producido por la planta. En la rizosfera se realizan múltiples y complejas interacciones entre los microorganismos y las estructuras vegetales (Benjumeda, 2017) y es el ambiente propicio para la proliferación de las poblaciones microbianas (Habib, 2010). En esta zona se han encontrado hasta 10^9 células por gramo de suelo debido a la intensa actividad biológica y química promovida por los compuestos exudados por las propias raíces. Entre estos compuestos se encuentran ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, pequeños péptidos, auxinas y otros metabolitos secundarios (Benjumeda, 2017).

En el suelo existe una amplia diversidad de bacterias que, al crecer en asociación con las plantas, estimulan el crecimiento y la productividad vegetal. A este grupo de bacterias beneficiosas se les denomina “bacterias promotoras de crecimiento vegetal” (BPCV, Ferrera y Alarcón, 2007). Los mecanismos de acción de estas bacterias son diversos: pueden ser indirectos como la producción de moléculas que ayudan a movilizar o solubilizar nutrimentos, o directos como la participación en los ciclos de nutrimentos (fijación de nitrógeno, degradación de la materia orgánica), o la producción de sustancias orgánicas como antibióticos, auxinas, vitaminas, que son resultado de su metabolismo secundario y que promueven respuestas fisiológicas en células vegetales. Entre estas respuestas se encuentra el incremento de la longitud y la biomasa de las raíces, y con ello, la zona de absorción de nutrimentos (Rueda et al, 2009; Mejía, 2016).

Las BPCV se utilizan para producir biofertilizantes porque presentan ciertas ventajas sobre los fertilizantes químicos, como la promoción de las interacciones benéficas para las plantas, con lo cual se mejora el rendimiento de los cultivos sin causar daños en el suelo o en la salud humana (Rueda et al, 2009).

Los beneficios de utilizar BPCV en la agricultura pueden clasificarse como:

1. Fotoestimulantes: estimulan la germinación de las semillas y el enraizamiento por la producción de reguladores de crecimiento vegetal como vitaminas y hormonas entre otras sustancias.
2. Biofertilizantes: incrementan el suministro de los nutrimentos por su acción en los ciclos biogeoquímicos
3. Agentes de control biológico: control de patógenos a partir de interacciones de antagonismo entre microorganismos
4. Biorremediadores: eliminan productos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas.
5. Mejoradores ecofisiológicos: incrementan la resistencia al estrés tanto de origen biótico como abiótico.

Las bacterias solubilizadoras de fósforo forman parte de las BPCV y se consideran biofertilizantes debido a que realizan la transferencia de las formas fosfatadas insolubles e inmovilizadas del fósforo a formas solubles o compuestos móviles (Campbell y Reece, 2007). La movilización del fosfato inorgánico insoluble desde la matriz mineral hasta el suelo donde es absorbido por las raíces promueve el metabolismo vegetal y suministra compuestos carbonados que promueven el crecimiento microbiano y la propia actividad solubilizadora de fosfatos (Valero, 2003, Pérez, 2007). De esta manera, la abundancia de las solubilizadoras de fósforo está relacionada directamente con la abundancia y actividad fisiológica de las plantas (Archer y Pyke, 1991).

La solubilización del fósforo del suelo forma parte de los mecanismos indirectos con los cuales las bacterias actúan de manera benéfica sobre las plantas. Las bacterias solubilizadoras tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos que son el resultado de la respiración oxidativa o de la fermentación. Estos ácidos son

quelantes del ión calcio y a su vez acidifican el medio. En la solubilización del fósforo también están involucradas enzimas fitasas que permiten la liberación del fósforo insoluble a partir de la hidrólisis de fosfatos orgánicos (Corrales et al, 2014). Las bacterias solubilizadoras de fósforo utilizan diferentes mecanismos para liberar a los compuestos fosfatados. Entre ellos se encuentran la disociación de los ácidos orgánicos que promueven la liberación de protones y la disminución del pH del suelo. Esto favorece la disolución de los minerales fosfóricos a través de las reacciones de quelación donde se libera al grupo ortofosfato debido al desplazamiento de los fosfatos por los componentes aniónicos de los ácidos orgánicos.

Cada mecanismo de acción para liberar el fosfato tiene reacciones específicas sobre compuestos fosfatados particulares (Tabla 1).

Tipo de mecanismo	Principal causa de disolución mineral	Principal reacción que lleva a la disolución mineral	Aplicabilidad a fosfatos minerales
Acidificación del medio	Liberación de protones (H ⁺) o producción de ácidos inorgánicos fácilmente dissociables	Disminución del pH del medio, formación de hidrofosfatos de mayor solubilidad	Fosfatos de Ca ₂ ⁺
Formación de complejos metálicos	Liberación de ácidos orgánicos o complejos quelantes	Formación de complejos metálicos (incluyendo quelatos en el caso de ácidos ditricarboxílicos o hidrocarboxílicos)	Fosfato de Ca, Al ³⁺ y Fe ³⁺
Reducción de metales	Actividades redox de bacterias o sus exudados (metabolitos secundarios)	Reducción de metales con estado de oxidación variable (ligados a fosfatos) a un bajo estado de oxidación (resultando en un fosfato más soluble)	Fe ₃₊ fosfato
Disolución de fosfatos mediada por enzimas	Liberación extracelular de enzimas específicas (fosfatasas)	Hidrólisis enzimática de ésteres de fosfato orgánicos pobremente solubles liberando fosfatos inorgánicos	Varios ésteres de fosfatos orgánicos (fitatos, fosfolípidos)
Disolución indirecta de fosfatos	Estimulación microbiana de exudación de ácidos orgánicos a la planta	Mismo mecanismo que en formación de complejos metálicos pero la liberación ocurre por la interacción planta-microorganismo	Fosfatos de Ca ₂ ⁺ , Al ₃ ⁺ y Fe ₃ ⁺

Tabla 1. Procesos involucrados en la solubilización de fósforo del suelo por bacterias (Restrepo et al, 2015).

El suelo es un sistema complejo en el que los microorganismos se comunican químicamente mediante un mecanismo denominado *quorum sensig*. Este mecanismo se activa cuando hay una acumulación de señales que permiten a una célula bacteriana individual percibir a las bacterias que hay alrededor a través de la detección de compuestos químicos de señalización. De esta manera, las bacterias inician la expresión coordinada de genes específicos con lo cual hay un cambio en su comportamiento. En el caso de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, este cambio puede repercutir en un beneficio mayor para la planta debido a la actividad conjunta de las bacterias de diferentes especies (Díaz, 2011).

Para la solubilización de fósforo, en algunos estudios se ha reportado que el uso de biofertilizantes combinados con diferentes especies de bacterias solubilizadoras tiene un efecto positivo en la planta. Por ejemplo, en *Phaseolus vulgaris* (Shiferaw, 2013) y *Vicia faba* (Flores, 2018) se reportó un incremento en la tasa de germinación. Incluso, en esta última investigación también se incrementaron la longitud de la radícula, el índice de vigor y la disponibilidad de fósforo en el sustrato. Estos resultados sugirieron un incremento en la promoción del crecimiento vegetal derivado del incremento en la solubilización del fósforo y probablemente de la producción de hormonas que favorecen diversos procesos biológicos de la planta.

2. Justificación

En los ecosistemas terrestres limitados en fósforo, por ejemplo, los suelos de las zonas áridas, la actividad biológica de las bacterias solubilizadoras de fósforo podría formar parte esencial de los procesos que sostienen la productividad primaria. Estas bacterias actúan sobre los minerales y las rocas fosfatadas y contribuyen con la biodisponibilidad de las formas inorgánicas de fósforo que las plantas y otros microorganismos pueden utilizar en sus procesos metabólicos e incorporar a su biomasa. El uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal puede contribuir al mejoramiento de las condiciones nutrimentales de los suelos limitados en fósforo, y para ello es necesario analizar la respuesta de las plantas a los biofertilizantes bacterianos formados por cultivos puros y mixtos, de tal manera que se promueva el efecto benéfico de la actividad microbiana en diferentes aspectos del desarrollo de la planta. En este contexto, en esta tesis se plantearon como pregunta de investigación y objetivos, los siguientes:

3. Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de la inoculación y coinoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo en la tasa de germinación, crecimiento y desarrollo de *Solanum lycopersicum* y en la disponibilidad de fósforo en el suelo?

4. Hipótesis

La inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo incrementará la tasa de germinación de semillas, y el crecimiento y biomasa de plantas de *Solanum lycopersicum*; mientras que el uso de coinóculos incrementará la magnitud de dichas variables. También la aplicación de inóculos y coinóculos bacterianos favorecerá la disponibilidad de fósforo soluble en el suelo en forma del ion PO_4^- .

5. Objetivo general

Determinar el efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF) en cultivos puros y mixtos sobre la germinación, crecimiento y biomasa de *Solanum lycopersicum* y sobre la disponibilidad de fósforo en el suelo.

5.1. Objetivos particulares

Evaluar el efecto de la inoculación de cultivos puros y mixtos de BSF sobre el porcentaje de germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* en sistemas *in vitro*.

Evaluar el efecto de la inoculación de cultivos puros y mixtos de BSF en la biomasa aérea y subterránea de plantas de *Solanum lycopersicum* crecidas en microcosmos con suelo.

Evaluar el efecto de la inoculación de cultivos puros y mixtos de BSF en la disponibilidad de fósforo en suelo.

6. Materiales y métodos

6.1. Obtención de bacterias solubilizadoras de fósforo

Las bacterias solubilizadoras de fósforo fueron aisladas de suelo colectado en los años 2009 y 2014 en la región semiárida de Zapotitlán Salinas, Puebla, en el marco de otras investigaciones realizadas en el laboratorio de Ecología Microbiana de la UBIPRO, FES Iztacala, UNAM.

Para la realización del presente trabajo se seleccionaron cuatro UTO, dos de ellas pertenecientes al género *Streptomyces* y las otros dos con características coloniales de forma convexa y aspecto cremoso, no filamentosas (Tabla 2). La selección de estas cuatro UTO se basó en pruebas de crecimiento en cajas Petri con medio Pikovskaya adicionado con azul de bromotimol, el cual contiene como fuente de fósforo insoluble al fosfato de calcio tribásico. Estas UTO se consideraron como bacterias solubilizadoras de fósforo porque formaron un halo con tonalidad amarilla-blanca alrededor de la colonia después de 7 días de incubación a 28°C. La formación de este halo indica la solubilización del fósforo presente en el medio de cultivo.

Fecha de colecta del suelo	Microambiente de aislamiento	Número de UTO	Especie
marzo de 2014	suelo rizosférico de mezquite	19	Sin identificación UTO19
octubre de 2009	Suelo rizosférico de mezquite	120	Sin identificación UTO120
marzo de 2014	suelo rizosférico de mezquite	347	<i>Streptomyces chartreusis</i>
junio de 2014	suelo rizosférico de mezquite	453	<i>Streptomyces canus</i>

Tabla 2. Características de los cultivos bacterianos seleccionados

6.2. Determinación del índice de solubilización de fósforo

Para confirmar que las cuatro UTO seleccionadas solubilizaban fósforo del medio de cultivo, se determinó el índice de solubilización de fósforo (IS). Este índice es un indicador de su capacidad para solubilizar el fosfato de calcio tribásico presente en el medio de cultivo Pikovskaya. Para ello, se registró el diámetro del halo que se formaba alrededor de la colonia después de 7 días de incubación (Figura 1). Se realizaron tres réplicas por cada UTO. Cada réplica consistió en una caja Petri con tres gotas de cultivo bacteriano separadas de manera equidistante. Se obtuvo el promedio del halo por réplica (caja Petri) y luego el promedio del índice de solubilización de las tres réplicas. El índice se calculó con la siguiente fórmula:

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

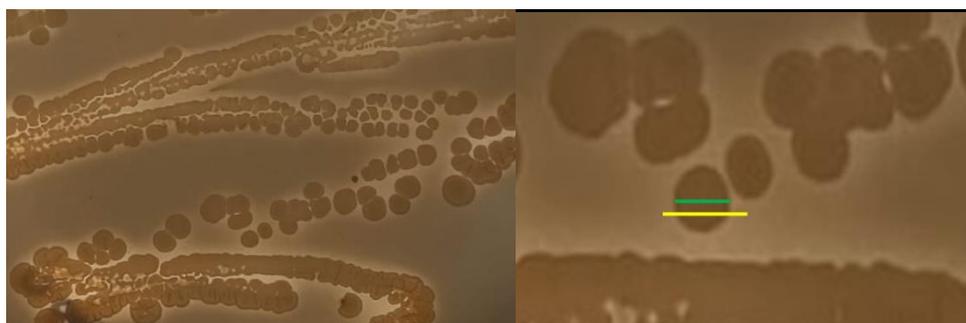


Figura 1. Colonia bacteriana en medio Pikovskaya. La línea verde representa el diámetro de la colonia y la línea amarilla, el diámetro del halo de solubilización. La imagen corresponde a la UTO 347 (*Streptomyces chartreusis*).

6.3. Preparación de inóculos y coinóculos

Con las cuatro UTO seleccionadas se realizaron pruebas de compatibilidad a través de experimentos de reto. Estos experimentos consistieron en crecer manera simultánea y en la misma caja de cultivo, a las bacterias para las cuales se requería conocer su compatibilidad (Figura 2). Se realizó una matriz que incluyó a las UTO que se retaron entre sí. Las pruebas de reto se realizaron en medio Pikovskaya adicionado con azul de bromotimol en las cuales se sembraron dos líneas paralelas de bacterias, una para cada cepa o UTO separadas por una distancia de 0.5 mm y con un cruce al final de cada línea. Las cajas se incubaron por 7 días a 28°C. Las posibles respuestas esperadas fueron: a) inhibición del crecimiento de una de las UTO, lo cual se consideró como incompatibilidad entre ellas; o b) establecimiento de consorcios, es decir, que hubiera crecimiento de ambas UTO, lo cual se consideró como compatibilidad entre las UTO.

Los resultados de compatibilidad permitieron diseñar la combinación de cepas o asilamientos bacterianos (coinóculos) que se ocuparon en los experimentos *in vitro* y en los microcosmos utilizados para cumplir los objetivos de esta tesis.

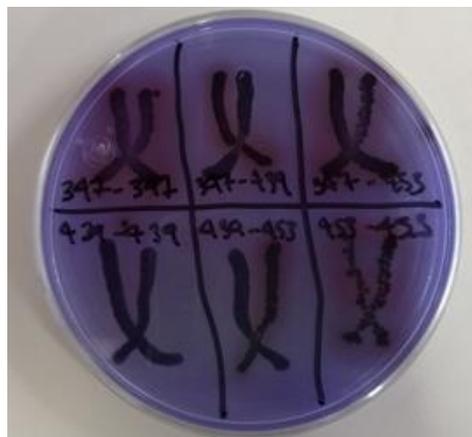


Figura 2. Ejemplo de las pruebas de reto para determinar la compatibilidad entre las bacterias. Se observa que aún con el cruce de las líneas de cultivo, existe compatibilidad entre las diferentes colonias bacterianas,

6.4. Determinación de la cantidad de bacterias inoculadas

En todos los casos donde se ocuparon los inóculos y los coinóculos, las UTO se sembraron en medio de cultivo sólido para *Streptomyces* y se dejaron crecer durante una semana en incubación a 28°C con el fin de obtener suficiente biomasa bacteriana. Posteriormente se suspendieron varias colonias en medio líquido para *Streptomyces* y se mantuvieron en incubación durante 1 hora. La inoculación bacteriana tanto en los experimentos *in vitro* como en microcosmos (secciones siguientes), se realizó con los cultivos ajustados a una concentración de 1×10^7 bacterias, usando la curva de McFarland como curva patrón.

6.5. Experimentos de germinación *in vitro*

En los experimentos de germinación *in vitro* se utilizaron 9 tratamientos: cuatro correspondientes a inóculos puros, cuatro a coinóculos formados por dos UTO o cepas bacterianas, y el último tratamiento consistió en el grupo control, en el que se usó agua estéril (Tabla 3):

Inóculos puros (Número de UTO o cepa)	Coinóculos Cultivos mixtos formados por dos cepas o UTO.
19	19+120
120	19+347
347	19+453
453	347+453
Grupo control: agua sin inóculo bacteriano	

Tabla 3. Inóculos puros y coinóculos utilizados para experimentos de germinación *in vitro* de *S. lycopersicum*

6.5.1. Porcentaje de germinación

Los experimentos de germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* se realizaron en cajas Petri con papel filtro previamente esterilizado en donde se colocaron 30 semillas de manera equidistante. Se realizaron 5 repeticiones por cada inóculo y coinóculo y se consideró como unidad experimental a cada caja con 30 semillas.

Las semillas fueron embebidas con 20 μ l del inóculo puro o con el coinóculo bacteriano correspondiente a cada tratamiento y después de 10 min o de que el inóculo secase, se humedeció el papel con agua estéril. Las cajas se taparon y se mantuvieron a temperatura ambiente por siete días. Después de este tiempo, se contó el número de semillas germinadas en cada caja y se obtuvo el porcentaje de germinación por tratamiento. Se consideró que la semilla había germinado cuando se observó la emergencia de la radícula. Los resultados de esta sección se reportan como promedio de germinación por cada tratamiento.

6.5.2. Índice de vigor de las plántulas

Después de evaluar el porcentaje de germinación, a las plántulas se les midió la longitud (cm) del hipocótilo y de la raíz (Figura 3). Con estos valores se calculó el índice de vigor (IV) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IV = (\text{longitud de hipocótilo} + \text{longitud de radícula}) * pg$$

Dónde: IV es índice de vigor y pg es porcentaje de germinación.
(Flores et al, 2018).



Figura 3. Plántulas de *S. lycopersicum* para medición de longitud del hipocótilo y de la raíz. Con estos valores se calculó el índice de vigor.

6.6. Experimentos en microcosmos

Para la determinación del efecto de los inóculos y coinóculos sobre la biomasa aérea y radical de *S. lycopersicum*, así como en la disponibilidad de fósforo en suelo, se realizaron experimentos en microcosmos en donde se utilizó una mezcla de suelo-agrolita previamente esterilizada (Sección 5.6.1). En estos experimentos se utilizaron ocho tratamientos: siete correspondientes a los inóculos y coinóculos bacterianos, más un grupo control (tabla 4). Se redujo el número de tratamientos por la cantidad de semillas con las que se contaba y por la contaminación de una de las UTO utilizadas. Al no utilizar la UTO 120 que si está presente en los experimentos de germinación, se agregó un tratamiento con la combinación de las 3 UTO mencionadas en la tabla 4.

Inóculos (Número de UTO o cepa)	Coinóculos Cultivos mixtos formados por dos cepas o UTO
19	19+347
347	19+453
453	347+453
	19+347+453
Grupo control: agua sin ningún tipo de inóculo	

Tabla 4. Tratamientos de inóculos puros y combinaciones de UTO bacterianas utilizados como tratamientos en experimentos en microcosmos.

6.6.1. Obtención y preparación del suelo para los microcosmos

El suelo utilizado para realizar los experimentos en microcosmos provenía de las terrazas aluviales de Zapotitlán Salinas, Puebla. Los suelos de la zona son fluvisoles con textura arcillo-arenoso, con alto contenido de calcio y bajo contenido de fósforo disponible (López-Galindo, et al, 2003).

El suelo fue colectado en diferentes años, y se encontraba almacenado a 4°C en el laboratorio de Ecología Microbiana de la UBIPRO, FES Iztacala, UNAM. El suelo fue tamizado y esterilizado por 30 minutos en 3 ciclos de autoclave a 121°C y 137 KPa de presión. Previo a la esterilización, el suelo fue mezclado con agrolita en una proporción de 3:1 con el fin de mejorar el drenaje dentro de los microcosmos. Antes de montar los microcosmos, se tomaron tres muestras de suelo para la determinación del fósforo disponible.

6.6.2. Montaje de microcosmos

Los microcosmos se prepararon con la mezcla de suelo-agrolita previamente esterilizada en contenedores de plástico con una capacidad de 250 ml, al cual se le agregaron 200 gramos de la mezcla. Para la asignación de las unidades

experimentales y la aplicación de los tratamientos, se siguió un diseño completamente aleatorizado con 10 microcosmos por cada tratamiento de inóculo y coinóculo y el control, que consistió en solo agregar agua esterilizada.

El suelo se llevó al 60% de su capacidad de campo y se mantuvo con esa humedad a lo largo del experimento a través del monitoreo de la diferencia de peso de cada contenedor. Se colocaron dos semillas de *S. lycopersicum* por cada recipiente. Las semillas se adquirieron en un establecimiento comercial especializado. Al inicio del experimento, se aplicó 1 ml de inóculo con concentración 1×10^7 bacterias sobre cada semilla y una segunda inoculación a las siete semanas de crecimiento de las plantas. La reinoculación se realizó vaciando la misma cantidad de bacterias que en la primera inoculación (en concentración y volumen) en la base del tallo.

Las plantas fueron monitoreadas por un periodo de catorce semanas, siete semanas previas a la reinoculación y siete semanas posteriores a ésta. Previo a la reinoculación, se midió la longitud del tallo y se tomó una muestra de suelo para la determinación del fósforo disponible.



Figura 4. Vista general e individual de los microcosmos al inicio del experimento y a las siete semanas.

Después de 14 semanas de crecimiento, las plantas se desmontaron volcando los microcosmos y retirando cuidadosamente el suelo que quedó adherido a la zona de raíces. Posteriormente, se midió la longitud del tallo y de la raíz de todas las plantas (Figura 5). Después, para obtener el peso seco de las plantas, se colocaron en sobres de papel craft y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 semanas. Posteriormente se pesaron en la balanza semianalítica.



Figura 5. Registro de longitud de raíz y tallo en plantas de *S. lycopersicum* a las 14 semanas de inoculación con bacterias solubilizadoras de fósforo. La imagen pertenece a plantas inoculadas con el tratamiento formado por la UTO 19 y las cepas 347-*Streptomyces chartreusis* y 453-*Streptomyces canus*.

6.6.3. Disponibilidad de fósforo en suelo

Al inicio del experimento, se midió la cantidad de fósforo disponible en el suelo (tiempo cero), y esta misma medición se realizó con muestras de suelo de 1 gramo tomadas de cada microcosmos antes de la reinoculación (tiempo A) y al final del experimento (tiempo B). La determinación de fósforo se realizó mediante la técnica colorimétrica de Olsen modificada por Iniestra *et.al.* (2013). Se utilizó bicarbonato de sodio como extractante.

6.7. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de ANOVA para todas las variables, con excepción del índice de vigor. Cuando el análisis resultó significativo, se realizaron pruebas de Tukey para determinar entre cuáles tratamientos se encontraban las diferencias significativas. En el caso del porcentaje de germinación, los datos fueron transformados previamente a la realización del ANOVA con la función arcoseno. Además, para el análisis de la longitud de tallo y las ppm de fósforo se realizó la prueba de t para muestras dependientes.

7. Resultados

7.1. Índice de solubilización de las UTO seleccionados

El primer paso para determinar la capacidad solubilizadora de fósforo de las UTO y cepas bacterianas seleccionadas, fue determinar su índice de solubilización. Los resultados mostraron que los cuatro cultivos presentaron índices de solubilización similares en el medio de cultivo Pikovskaya. El valor máximo lo presentó la UTO 19 (2.89 cm), y el mínimo la UTO 120 (2.27 cm; Tabla 5)

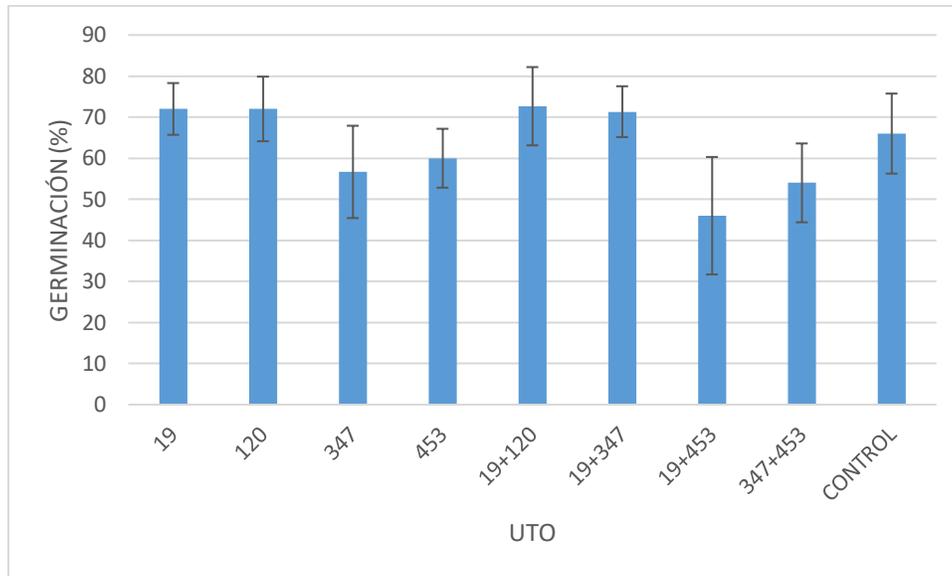
UTO/Cepa	Índice de solubilización
19	2.89 ± 0.089
120	2.27 ± 0.063
347 <i>Streptomyces chartreusis</i>	2.48 ± 0.067
453 <i>Streptomyces canus</i>	2.65 ± 0.077

Tabla 5. Índice de solubilización de las UTO y cepas solubilizadoras de fósforo (N=3).

7.2. Experimentos de germinación *in vitro*

7.2.1. Germinación

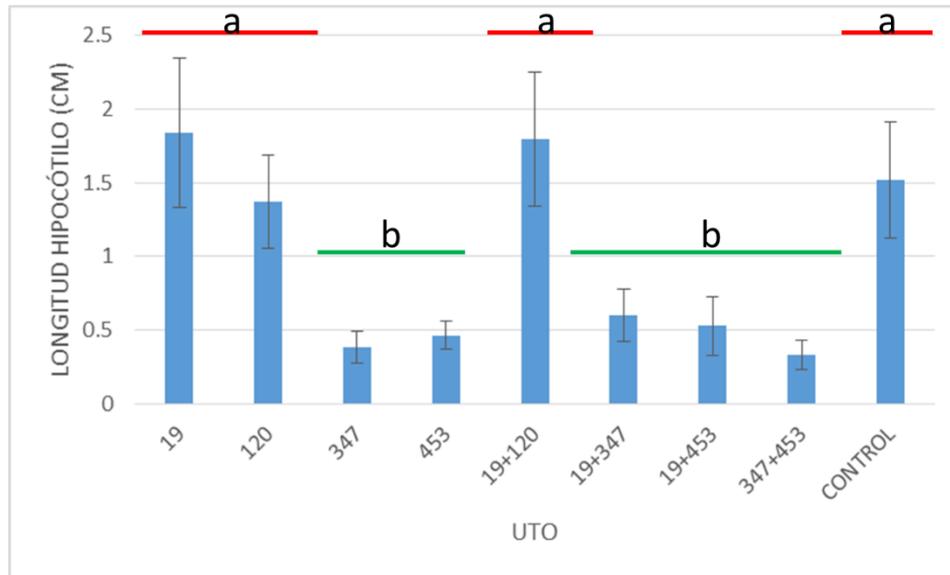
En los experimentos de germinación *in vitro* no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación con las cuatro cepas y UTO bacterianas y sus combinaciones. Sin embargo, las semillas inoculadas con las UTO 19 y 120 y su combinación, y la 19+347-*S. chartreusis* presentaron arriba de 70% de germinación, mientras que la combinación 19+453-*S. canus* fue la que presentó la menor proporción de semillas germinadas (46%). El tratamiento testigo, que consistió en humedecer las semillas únicamente con agua destilada estéril, presentó 66% de germinación.



Gráfica 1. Promedio del porcentaje de germinación de semillas de *S. lycopersicum* inoculadas con cultivos puros y mixtos de diferentes cepas y UTO bacterianas. La cepa 347 corresponde a *Streptomyces chartreosis*, y la 453 a *Streptomyces canus*. Las barras representan el promedio (N=5) con desviación estándar.

7.2.2. Longitud del hipocótilo

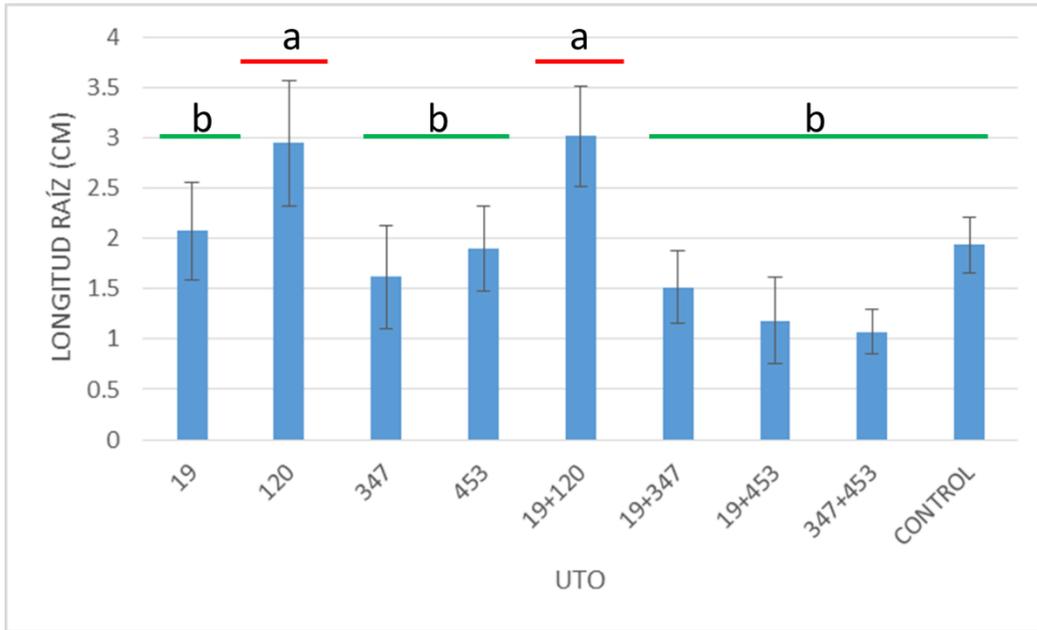
De acuerdo con el ANOVA, la inoculación con las diferentes bacterias y sus combinaciones mostró diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación sobre la longitud del hipocótilo. La prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró que los tratamientos con las UTO 19, 120, y su combinación y el grupo control, fueron significativamente mayores que el resto de los tratamientos, y a su vez, la prueba indicó que entre ellos no había estas diferencias. Los tratamientos con las UTO 19, coinóculo 19+120 y el grupo control presentaron promedios por arriba de 1.5 cm de longitud del hipocótilo mientras que el resto de las bacterias (con excepción del tratamiento con la UTO 120) y sus combinaciones alcanzaron únicamente alrededor de 0.5 cm de longitud del hipocótilo (Gráfica 2).



Gráfica 2. Longitud del hipocótilo en diferentes tratamientos de inoculación con bacterias. La cepa 347 corresponde a *Streptomyces chartreosis* y la 453 a *Streptomyces canus*. Las barras representan el promedio (N=5) con desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P > 0.05$).

7.2.3. Longitud de raíz

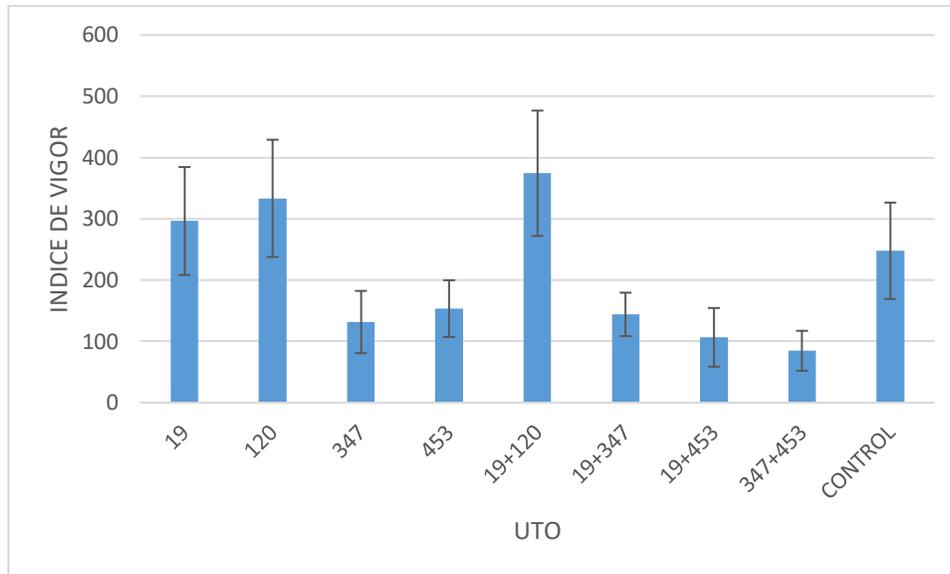
Con respecto a la longitud de la raíz, el ANOVA mostró que existían diferencias significativas entre los tratamientos. En la gráfica 3 se observa que los tratamientos con las UTO 19 y coinóculo 19+120, presentaron un promedio de alrededor de 3 cm en la longitud de la raíz, mismo que fue estadísticamente mayor que el resto de los tratamientos incluido el grupo control, los cuales no presentaron diferencias entre ellos.



Gráfica 3. Longitud de la raíz en diferentes tratamientos de inoculación con cultivos puros y mixtos de bacterias. La cepa 347 corresponde a *Streptomyces chartreosis* y la 453 a *Streptomyces canus*. Las barras representan el promedio (N=5) con desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P > 0.05$).

7.2.4. Índice de vigor

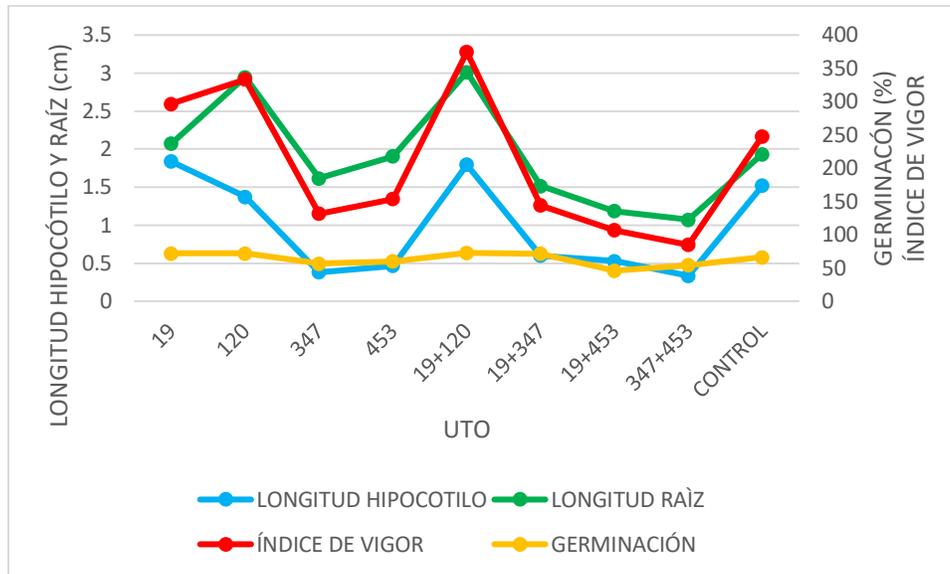
El índice de vigor es una variable que permite analizar la relación entre el crecimiento de la raíz y el hipocótilo y el porcentaje de germinación. El mayor valor de este índice lo presentó la combinación de 19+120 y la menor relación los actinomicetes 347-*S. chartreus* y 453-*S. canus* (Gráfica 4).



Gráfica 4. Promedio del índice de vigor del germinado de *S. lycopersicum* inoculados con cultivos bacterianos puros y mixtos. La cepa 347 corresponde a *Streptomyces chartreosis* y la 453 a *Streptomyces canus*. Las barras representan el promedio (N=5) con desviación estándar.

7.2.5. Resumen de resultados de experimentos *in vitro*

En la gráfica 5 se presenta el comportamiento conjunto de las tres variables registradas en los experimentos *in vitro* y que conformaron el índice de vigor. Se observan diferentes relaciones entre ellas, por ejemplo, la inoculación con la combinación 19+120 promovió en mayor medida la longitud del hipocótilo, de la raíz y el porcentaje de germinación; mientras que en la combinación 19+347 su efecto de promoción se observó únicamente en la germinación. Con la cepa 347-*Streptomyces chartreosis* inoculada de manera individual, y también en combinación con el aislamiento 19, se presentaron valores relativamente bajos de las tres variables. Estos resultados muestran que la promoción del crecimiento vegetal por cada una de las cepas y UTO aplicados a la semilla de *S. lycopersicum* es diferente en cada etapa y estructura de la planta.



Gráfica 5. Resumen de los resultados de los componentes del índice de vigor. La cepa 347 corresponde a *Streptomyces chartreosis* y la 453 a *Streptomyces canus*.

7.3. Experimentos de inoculación en microcosmos

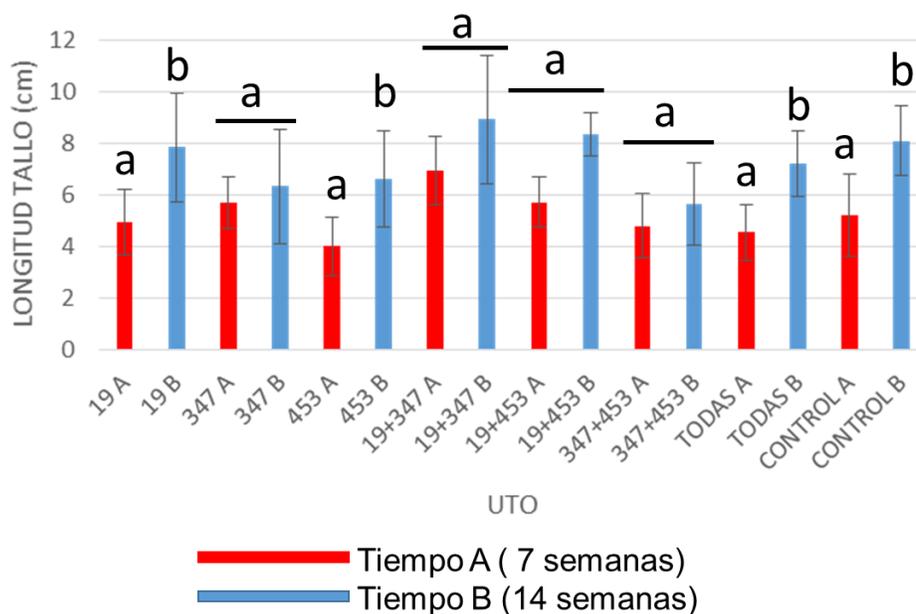
Los tratamientos de inoculación bacteriana en microcosmos presentaron los siguientes resultados en las plantas y en el fósforo disponible en el suelo:

7.3.1. Longitud del tallo

La longitud del tallo se registró a las 7 semanas (Tiempo A; mitad de tiempo del experimento y momento de reinoculación con bacterias) y a las 14 semanas de crecimiento de las plantas (Tiempo B; final del experimento). El tiempo B representa el crecimiento total de la planta.

El ANOVA aplicado a los valores de la longitud del tallo al interior de cada uno de los tiempos de registro no mostró diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos en ninguno de los dos tiempos analizados (A y B). Para complementar este análisis se realizaron pruebas de t pareada entre los valores de longitud del tallo registrados en cada uno de los tratamientos de inoculación, pero entre los

tiempos A y B. En este caso, la prueba mostró diferencias significativas entre los tiempos A y B para los tratamientos con la UTO 19, 453-*S. canus*, la combinación entre la UTO 19 y 453-*S. canus*, la combinación de todas las UTO y el grupo control. Consistentemente, en todos los casos, aún sin encontrar diferencias estadísticamente significativas, la mayor longitud del tallo se registró en el tiempo B.



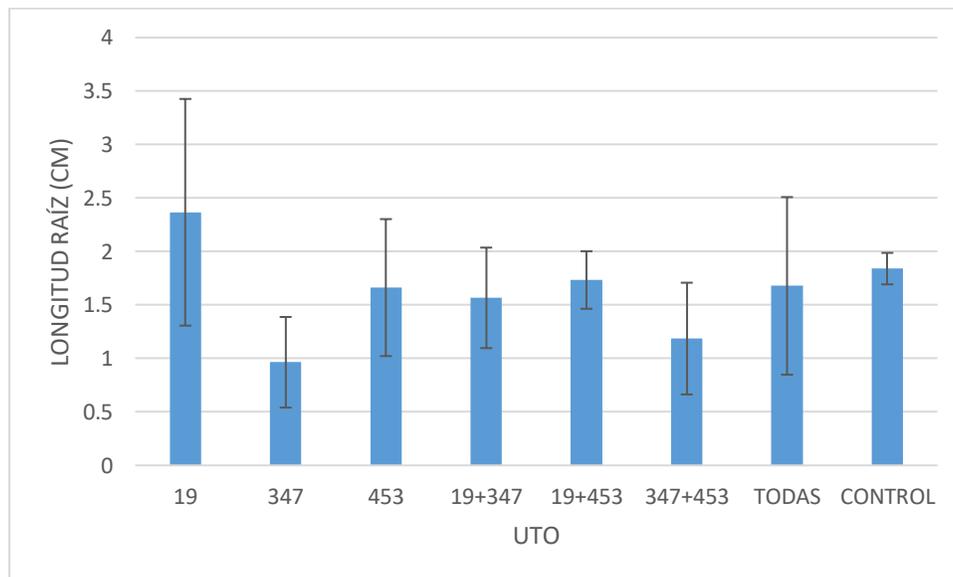
Gráfica 6. Promedio de la longitud (cm) de las plantas de *S. lycopersicum* inoculada con cultivos puros y mixtos de UTO de bacterias. Las barras representan el promedio (N=10) y la desviación estándar. La cepa 347 corresponde a *Streptomyces chartreosis*, y la 453 a *Streptomyces canus*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos A y B para cada tratamiento bacteriano. El tiempo B es el crecimiento total de la planta. La barra de “Todas” representa la combinación de las UTO 19, 347 y 453.

7.3.2. Longitud de raíz principal

La medición de la raíz principal únicamente se realizó en el tiempo B (14 semanas) debido a que, para acceder a ella, fue necesario desmontar los microcosmos. En

este caso, el ANOVA no arrojó diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos (Gráfica 7).

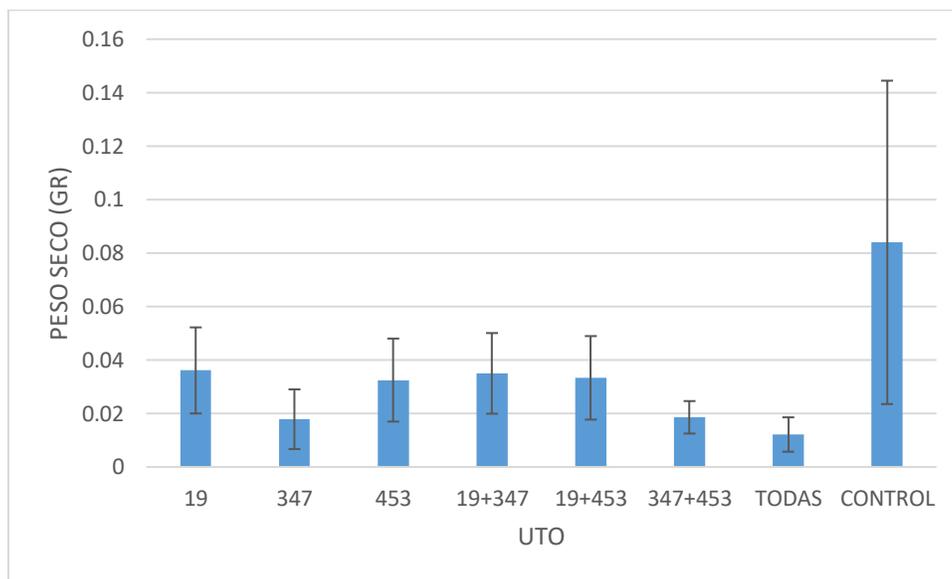
En el grupo control se presentó la menor dispersión de los valores de las plantas individuales, alcanzando un valor promedio de 1.8 cm (± 0.294), aunque este valor estuvo por debajo del valor máximo promedio alcanzado para esta variable con la UTO 19, donde llegó a casi 2.5 cm en promedio. En sentido contrario, las plantas inoculadas con la cepa 347-*S. chartreosis* presentaron el menor valor promedio, quedando por debajo de 1 cm en la longitud de la raíz.



Gráfica 7. Promedio de la longitud de la raíz de las plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con cultivos bacterianos solubilizadores de fósforo puros y mixtos. La cepa 347 corresponde a *Streptomyces chartreosis*, y la 453 a *Streptomyces canus*. Las barras representan el promedio (N=10) con desviación estándar. La barra de “Todas” representa la combinación de las UTO 19, 347 y 453.

7.3.3. Peso seco

En la gráfica 8 se observa que el grupo control presentó el mayor peso seco, pero también la mayor dispersión de los valores. Esto pudo influir para que el ANOVA no detectará diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación bacteriana.



Gráfica 8. Peso seco de las plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con cultivos puros y mixtos de bacterias. La cepa 347 corresponde a *Streptomyces chartreosis*, y la 453 a *Streptomyces canus*. Las barras muestran el promedio (N=10) con desviación estándar. La barra de “Todas” representa la combinación de las UTO 19, 347 y 453.

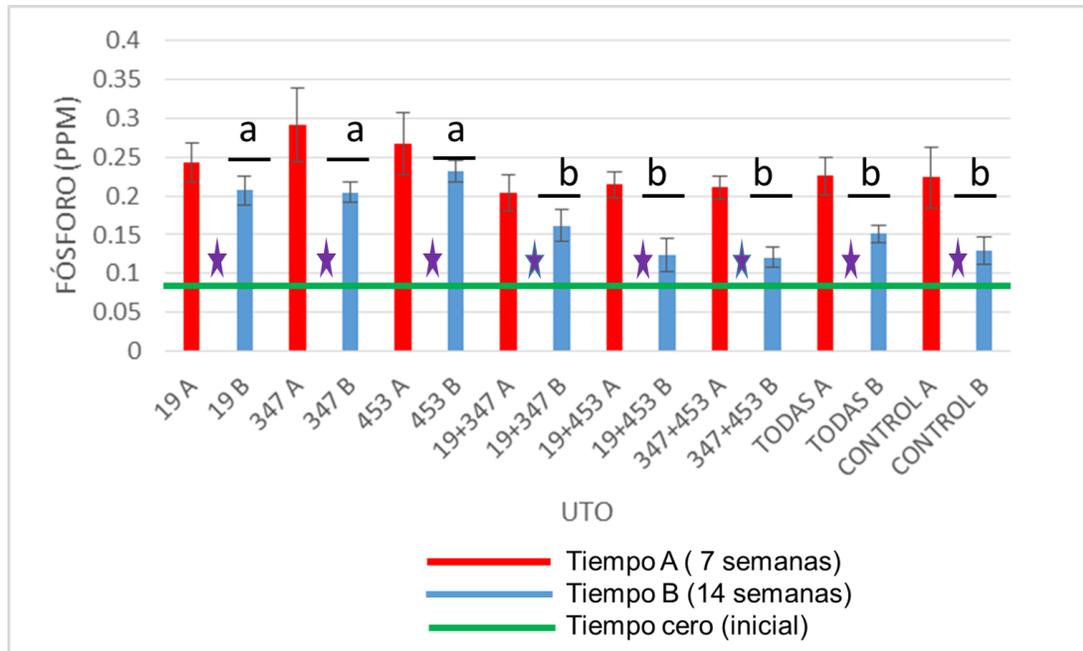
7.3.4. Disponibilidad de fósforo en suelo

El valor de fósforo disponible en el suelo antes de realizar la primera inoculación fue de 0.074 ppm (± 0.0037). Debido a que el suelo que se utilizó para los microcosmos provenía del mismo lote, este valor inicial se consideró como la línea base (tiempo

cero) para evaluar el efecto de la inoculación y reinoculación bacteriana en todos los tratamientos.

En la gráfica 9 se presentan los resultados obtenidos para el fósforo asimilable. Los análisis estadísticos realizados (ANOVA unifactorial para cada tiempo A y B entre los diferentes tratamientos de inoculación, y pruebas de t para muestras dependientes entre el tiempo A y B, y el valor de la línea base de fósforo y el obtenido en cada uno de los tiempos para cada tratamiento) mostraron que en el tiempo A (7 semanas de crecimiento de las plantas, previo a segunda inoculación) no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los diferentes cultivos puros o mixtos y el control (barras rojas, gráfica 9); pero en el tiempo B (14 semanas de crecimiento, final del experimento) la concentración de fósforo disponible en el suelo con las UTO 19, 347 y 453 fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) que para el resto de los tratamientos (barras azules, gráfica 9).

El contraste entre los diferentes tiempos dentro de cada tratamiento de inoculación mostró que la concentración de fósforo en el tiempo B fue significativamente menor ($P \leq 0.05$) en todos los casos. Esta misma tendencia de diferencias se presentó entre el valor obtenido en la línea base de fósforo en el tiempo cero ($0.074 \text{ ppm} \pm 0.0037$) y el valor para cada tratamiento en el tiempo A y en el tiempo B, respectivamente (asterisco entre la barra roja y azul para cada tratamiento).



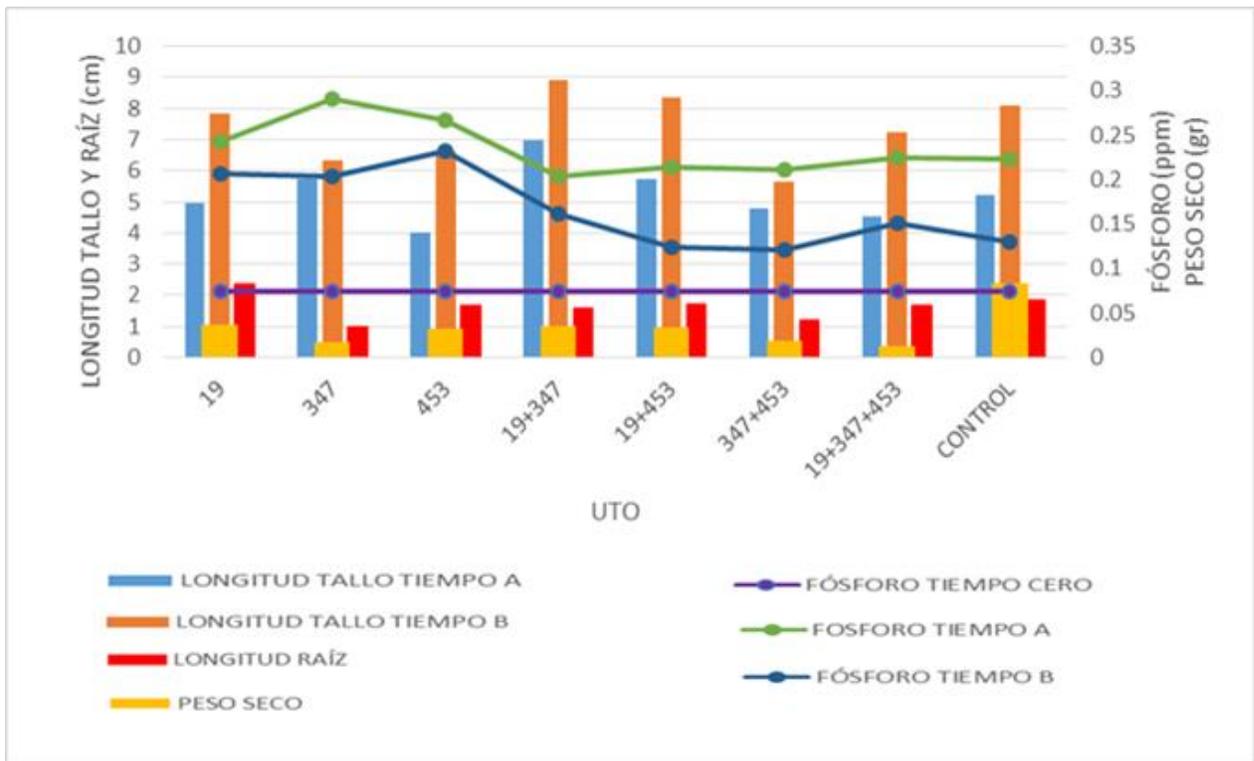
Gráfica 9. Promedio de ppm de fósforo en el suelo en tres tiempos de registro. La cepa 347 corresponde a *Streptomyces chartreosis*, y la 453 a *Streptomyces canus*. Las barras representan el promedio (N=10) con su respectiva desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas detectadas entre los tratamientos en el tiempo B. El asterisco indica diferencias significativas entre los tiempos cero y A, cero y B, A y B. La barra “Todas” representa la combinación de las UTO 19, 347 y 453

7.3.5. Resumen de resultados en microcosmos

En la gráfica 10 se presenta un resumen del comportamiento de las variables evaluadas en los microcosmos en los diferentes tratamientos. Entre las principales relaciones que se detectaron está el incremento de la longitud del tallo en el tiempo B (barra naranja) al mismo tiempo que disminuía la cantidad de fósforo disponible en el suelo (línea azul). Esto se observa de manera evidente en los tratamientos 19+347 y 19+453, donde se presentaron los mayores valores de la longitud del tallo en los tiempos A y B, y una marcada caída en la concentración del fósforo en el tiempo B. De manera particular, con la combinación 19+453 la diferencia en la longitud del tallo entre el tiempo A y el tiempo B fue de aproximadamente 2 cm, lo que representa aproximadamente 30% de incremento entre un punto y otro del

tiempo, mientras que la disminución en la concentración de fósforo fue de alrededor del 40%.

Respecto de la longitud de la raíz, no se pueden realizar contrastes entre los tiempos debido a que sólo se registró al final del experimento, sin embargo en la gráfica 10 se puede observar que la mayor longitud se registró en la UTO 120, donde la longitud del tallo en el tiempo B se encontró entre los valores más altos. Esto podría formar parte de la promoción del crecimiento vegetal a partir de otras moléculas producidas por las bacterias y que contribuyen con el desarrollo de la raíz.



Gráfica 10. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos en microcosmos. La cepa 347 corresponde a *Streptomyces chartreosis*, y la 453 a *Streptomyces canus*.

7.3.6. Integración de resultados en experimentos *in vitro* y en microcosmos

Con el fin de presentar de manera integrada el efecto de la inoculación de las bacterias en cultivos puros y mixtos, en la tabla 6 se presenta un resumen gráfico de todos los resultados obtenidos tanto en los experimentos *in vitro* como en los microcosmos. Se observa que hubo variables que fueron favorecidas por ciertos tratamientos *in vitro* pero no en los microcosmos.

En los experimentos *in vitro* donde las condiciones ambientales tenían un mayor control, los tratamientos representados por la UTO 19 y su combinación con la UTO 120 mostraron mayor capacidad de promoción del crecimiento vegetal en la etapa de germinación, y en la longitud de hipocótilo y de la raíz, aunque las diferencias significativas solo se presentaron en esta última variable. En los experimentos en microcosmos, la UTO 19 también mostró diferencias significativas respecto del control en el fósforo disponible en el suelo en el tiempo B, y tuvo un efecto positivo sobre la longitud de la raíz, aunque sin generar diferencias significativas. Esta misma UTO, al combinarse con las dos cepas de *Streptomyces* (347 y 453) formó coinóculos que promovieron el crecimiento del tallo por encima de los valores del grupo control, sin ser estadísticamente diferentes con respecto a éste.

Las dos cepas de *Streptomyces* (347 y 453) por si solas no mostraron resultados de promoción de crecimiento vegetal por encima del grupo control en la experimentación *in vitro*, pero ambas promovieron la disponibilidad de fósforo en el suelo de los microcosmos, sobre todo en el tiempo B. Cabe señalar que en la combinación de las cepas de *Streptomyces* 349 y 453 y en el coinóculo formado por el aislamiento 19, y las cepas de *Streptomyces* 347 y 453, el valor obtenido para todas las variables estuvo por debajo del control.

La combinación de resultados obtenidos con cada UTO o cepa inoculada ya sea de manera individual o en coinóculo sugieren que las bacterias y la planta se relacionan de manera diferente si se encuentran en condiciones *in vitro* o en el sistema suelo.

Tipo de experimentos										
Tratamientos	<i>In vitro</i>				Microcosmos					
	Germinación %	Longitud hipocótilo	Longitud raíz	Índice de vigor	Longitud tallo		Longitud raíz	Peso seco	Fósforo disponible	
					A	B			A	B
19	O	O	X	O	X	X	O	X	X	S
120	O	O	S	O						
347	X	X	X	X	X	O	X	X	O	S
453	X	X	X	X	X	X	X	X	O	S
19+120	O	O	S	O						
19+347	O	X	X	X	O	O	X	X	X	X
19+453	X	X	X	X	O	O	X	X	X	X
347+453	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
19+347+453					X	X	X	X	X	X
Control										

Tabla 6. Resumen de los resultados de inoculación y coinoculación con bacterias solubilizadoras de fósforo. Para la elaboración de esta tabla, se tomó como referencia el valor obtenido por el tratamiento control debido a que no contenía bacterias. El círculo representa un valor superior al control, pero sin significancia estadística; mientras que la S representa un valor significativamente superior al control y la X un valor menor. Las líneas azules significan que esos tratamientos no fueron aplicados en los experimentos *in vitro* o en microcosmos, según sea el caso. Para el caso de la longitud del tallo y el fósforo disponible, la letra A representa el tiempo 1 y la B el tiempo 2.

8. Discusión

La microbiota del suelo es esencial para mantener la dinámica de los nutrientes en los ecosistemas. Los microorganismos establecen múltiples relaciones en la rizosfera de las plantas, muchas de ellas benéficas para el crecimiento vegetal. Estas interacciones son la base para la elaboración de los biofertilizantes formulados con microorganismos.

La inoculación individual o combinada de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF), ha mostrado un efecto benéfico en la promoción del crecimiento vegetal de diversas especies. Por ejemplo, en *Baccharis macrantha* (Asteraceae) se registró un incremento significativo en el porcentaje de germinación, en la altura de las plántulas, en la longitud de las raíces y en el peso seco total (Ávila et al, 2015). Lara y Negrete (2015) reportaron que los tratamientos con consorcios de BSF generaron valores superiores en la longitud de la estructura aérea y de la raíz, así como en la cantidad de hojas del pasto Angleton con respecto al tratamiento con fertilizantes químicos. En el tomate, el género *Bacillus* incrementó la tasa de germinación en un 5% y se registró un efecto positivo en la longitud del tallo y en la cantidad de hojas (Martínez et al, 2013).

En este trabajo, las bacterias solubilizadoras de fósforo inoculadas en forma pura o en consorcio mostraron diferentes efectos dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta y de la cepa o UTO utilizada. En la etapa de germinación, ninguno de los tratamientos mostró diferencias significativas, aunque en algunos casos si se presentaron promedios por arriba del control (UTO 19 y 120 y su combinación). Estos resultados podrían explicarse debido a que la germinación requiere de la presencia de humedad, una adecuada oxigenación y dependiendo del tipo de planta o cultivo, de cierto rango de temperatura; mientras que, para el establecimiento de la plántula, los aspectos más importantes son las características fisiológicas y bioquímicas de las semillas, su reacción a las condiciones externas y la eficiencia al usar sus reservas durante la germinación (Peña-Valdivia et al, 2013). A su vez, todos estos elementos están involucrados en el vigor de la planta.

El vigor se entiende como el potencial biológico para el establecimiento rápido y uniforme de las plantas, incluso en condiciones desfavorables (González et al., 2008). Al agregar el inóculo a las semillas en forma líquida y mantenerlas en un ambiente controlado como es la caja Petri, se dieron las condiciones necesarias para que las semillas germinaran, independientemente de la presencia de las bacterias. En los sistemas *in vitro*, con la UTO 120 en cultivo puro se observaron valores superiores al control en el porcentaje de germinación y en la longitud del hipocótilo, y significativamente superiores en la longitud de la raíz. Sin embargo, al analizar de manera integrada las variables que conforman el índice de vigor (*in vitro*) se observó que con la combinación UTO 19+353-*S. chartreosis* se promovió la germinación y la longitud del hipocótilo y de la raíz por arriba del valor obtenido en el control, más que con las otras UTO y combinaciones de cepas.

En el experimento con microcosmos hubo una limitación por espacio y una presión derivada del drenaje de agua dentro de los contenedores. Aunque en estos experimentos no se evaluó el índice de vigor, la presencia de las bacterias podría haber ayudado a que las plantas respondieran a estas condiciones adversas solubilizando más fósforo, y acumulando biomasa en tallo y raíz. Estos resultados sugieren que con las UTO 19 y 120 hay una respuesta de promoción directa del crecimiento vegetal en el nivel de incorporación de biomasa (hipocótilo y raíz en sistemas *in vitro* y raíz y tallo en microcosmos), y en el caso de la UTO 19, también a través de la solubilización del fósforo en el suelo.

La mayor cantidad de diferencias significativas derivadas de la inoculación se observaron en la longitud la raíz *in vitro* con la UTO 120 y en el fósforo disponible en el suelo a las 14 semanas de crecimiento con los cultivos puros de las cepas de *Streptomyces* 347 y 453 y de la UTO 19. En el caso de las dos cepas de *Streptomyces* en cultivo puro no hubo un efecto positivo observable durante el experimento de germinación *in vitro*, pero en los experimentos en microcosmos su principal efecto se observó en el fósforo disponible en el suelo, mostrando con esto su capacidad de solubilización. Sin embargo, aún con la mayor disponibilidad del fósforo detectada en el suelo de los microcosmos inoculados con estas dos

especies de actinobacterias, las plantas no respondieron en la misma magnitud, incluso presentaron valores de tallo y raíz por debajo del control. Esto podría deberse a las limitaciones impuestas por otro tipo factores como la compactación del suelo, el espacio, la temperatura, o la disponibilidad de agua y de otros nutrimentos, lo que impidió el desarrollo de la planta.

En este trabajo se observó que los niveles de fósforo presentes en el suelo aumentaron en cada uno de los tratamientos tomando como referencia la línea base (tiempo cero) y hasta el tiempo A (siete semanas de crecimiento de las plantas) pero después al tiempo B (14 semanas de crecimiento) disminuyeron de manera significativa. El incremento en la concentración de fósforo entre el tiempo cero y el tiempo A podría estar relacionado con la actividad solubilizadora de las bacterias sobre el suelo, y que éstas se estaban estableciendo y eran de talla menor; mientras que la disminución entre el tiempo A y B se emparejo con el incremento en la longitud de las plantas y por lo tanto en la demanda de este elemento para ser incorporado a la biomasa vegetal o de los propios microorganismos. Patiño et al, en 2014 mostró que el uso de BSF (*Burkholderia ambifaria* y *B. lata*) dio como resultado un desarrollo mayor en las raíces secundarias y terciarias por lo que al adicionar roca fosfórica hubo una mayor absorción de este elemento lo cual se observó en el tejido foliar, la cantidad de fósforo encontrada en la planta demuestra hacia donde se movió dicho elemento, al ver ambos resultados se pudo concluir que los niveles de fósforo variaron al viajar del suelo a la planta.

Las cepas 347 y 453 pertenecen al género *Streptomyces*. Entre las principales características de estas actinobacterias está la producción de esporas con alta capacidad de resistencia a los cambios ambientales. Por mucho tiempo se consideró que no establecían interacciones mutualistas con las plantas, sin embargo, a partir de la investigación centrada en las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, se han detectado relaciones directas e indirectas entre ambos grupos biológicos (Olanrewaju, 2019) y su capacidad para solubilizar el fósforo tricálcico a través de la acidificación del sustrato (Condori-Pacsi, 2019). En los tratamientos con suelo en donde se utilizaron las dos cepas señaladas (347 y 453)

y la UTO 19 se presentaron diferencias estadísticamente significativas con el resto de los tratamientos en la concentración de fósforo disponible en el suelo en el tiempo B (14 semanas de crecimiento de la planta). Estos resultados se pueden interpretar como un indicador de una mayor eficiencia en la solubilización de fósforo por parte de estas bacterias, siempre y cuando se encuentren en cultivos puros, ya que este efecto no se observó cuando se encontraban en combinación con las otras UTO.

En los experimentos con suelo ninguno de los cultivos mixtos (coinóculos) contribuyó a incrementar la disponibilidad de fósforo en el suelo, como era esperable a partir del fenómeno *quorum sensing* y su crecimiento conjunto en los experimentos de reto en las cajas Petri. Estos resultados podrían estar relacionados con el cambio de ambiente que se dio al pasar de la caja Petri al suelo, donde las condiciones ambientales eran completamente diferentes a la homogeneidad de la caja Petri. La comunicación química entre las bacterias a través del mecanismo *quorum sensing* para su uso como biofertilizantes requiere de mayor investigación, de tal manera que se establezca la combinación adecuada de bacterias que promueva el crecimiento vegetal. La inoculación con cultivos mixtos de BPCV ha mostrado que con estos consorcios de bacterias (*Bacillus*) hay un incremento en el área foliar de plantas de jitomate cherry aunque también cabe mencionar que en las variables de la longitud del tallo y el crecimiento radicular no hubo diferencias significativas con respecto a tratamientos con una sola cepa (Quiroga, 2015).

La capacidad solubilizadora de las cepas de *Streptomyces* detectada de manera individual es este trabajo es un primer paso para proponer su uso combinado con inóculos de otras bacterias promotoras de crecimiento vegetal con el fin de obtener mejores resultados en el desarrollo de la planta. En otros estudios se ha observado que estas combinaciones incrementan de manera significativa la longitud del tallo en comparación con los tratamientos donde se utiliza exclusivamente a las bacterias solubilizadoras de fósforo (Oviedo e Iglesias, 2005). El- Tarabily et al (2008) reportaron que el coinóculo de *Streptomyces* sp. y *Micromonospora* sp. promovió el crecimiento de raíces y brotes de la planta de frijol en comparación al uso de los microorganismos por separado.

La deficiencia de fósforo en las plantas puede detectarse a través de un cambio en la coloración de las hojas verde oscuro a tonos rojizos o púrpuras, y por la formación de bandas moradas de antocianinas al borde de las hojas maduras debido a la falta de fósforo disponible para la síntesis de pentosas. Las plantas deficientes en este elemento también pueden mantener un color verde saludable, pero con crecimiento lento y madurez retardada (Wisuma, 2003). Si bien en este trabajo no se alcanzó el crecimiento de las plantas de jitomate hasta llegar a la floración (30-40 días en invernadero), durante las 14 semanas que duró el experimento en microcosmos no se observaron viraje de color en las hojas hacia tonos púrpura, lo que hace suponer que la cantidad de fósforo que estaba disponible en el suelo era suficiente para satisfacer las necesidades de las plantas, y que la deficiencia en el crecimiento podría estar más relacionada con variaciones ambientales de temperatura, limitación de espacio dentro de los microcosmos, disponibilidad de otros nutrientes o con la compactación del suelo, que aún con presencia de agrolita, representó un problema que pudo repercutir en el crecimiento y productividad vegetal.

El desierto de Zapotitán Salinas, Puebla es el sitio donde se colectó el suelo para aislar las bacterias y para montar los microcosmos. En esta zona, los suelos son de tipo litosoles, cambisoles y xerosoles cálcicos, los cuales son someros y pedregosos, y por lo general no son utilizados para las actividades agrícolas. Otra característica de estos suelos es su limitación en fósforo, el cual queda atrapado en forma de fosfatos de calcio y magnesio que no pueden ser ocupados por los organismos de manera directa. En este trabajo se evaluó la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de cuatro UTO y cepas de bacterias solubilizadoras de fósforo las cuales generaron diferentes respuestas en las plantas, tanto en experimentos *in vitro* como en microcosmos construidos con suelo de la misma zona. La presencia de estas bacterias y su actividad solubilizadora, pueden representar un punto de partida para continuar con la investigación de la promoción del crecimiento vegetal por bacterias nativas de los propios suelos limitados en fósforo. A partir de esto se podrían diseñar combinaciones de bacterias que ayuden a mejorar las condiciones nutrimentales del suelo, o promuevan el crecimiento

vegetal por otras vías y con ello incrementar la productividad de los sistemas agrícolas sin utilizar fertilizantes químicos.

9. Conclusiones

Se detectó un efecto en las variables medidas por el uso de inóculos y coínoculos de BSF. Se utilizaron cuatro UTO o cepas en cultivos puros y combinados que afectaron de diferente manera a la planta, aunque el principal efecto se observó en la disponibilidad de fósforo en el suelo. Se utilizaron dos tipos de ambientes (*in vitro* y suelo en microcosmos) en los cuales se observaron diferentes resultados en las plantas que fueron inoculadas con las mismas UTO. La inoculación con bacterias tuvo un efecto positivo en algunas de las variables que fueron medidas en *S. lycopersicum* por lo que la continuidad de esta línea de investigación permitiría profundizar en el estudio de los biofertilizantes como una opción accesible para su uso en suelos donde el fósforo es un factor limitante para el desarrollo de las plantas y las actividades agrícolas.

10. Bibliografía

- Antonio, I. (2015) Comunidades de bacterias solubilizadoras de fósforo presentes en la zona de raíces de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox* de Zapotitlán Salinas Puebla. [Tesis de Licenciatura]. UNAM. México.
- Anzuay, M., Angelini, J., Ludueña, L., Fabra, A. y Taurian, T. (2016) Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el crecimiento de plantas de maní en ensayos en microcosmos. 30 Jornada Nacional del Maní. Centro Ingenieros Agrónomos General Cabrera y Zona. www.ciacabrera.com.ar/jornada_del_maní/.
- Atlas, R., Bartha, R. (2002) Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Madrid-España: Pearson Educación S.A. 608 p.
- Ávila, E., Lizarazo, L., Cortés, F. (2015) Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizosfera. Acta Biológica. Colombia ;20(3):121-131p.
- Buckingham, S., Neff, J., Titiz-Maybach, B., y Reynolds, R. (2010) Chemical and textural controls on phosphorus mobility in drylands of southeastern Utah. *Biogeochemistry* 100: 105-120p
- Campbell, N., Reece, J. (2007) Biología. Médica Panamericana. 1197-1199 p.
- Condori, S., Fernández, P., y Valderrama, M. (2019). Aislamiento y caracterización de *Streptomyces* spp rizosféricos promotores del crecimiento vegetal. Idesia (Arica), 37(2), 109-116. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292019000200109>
- Dao, T. (2011) Extracellular enzymes in sensing environmental nutrients and ecosystem changes: Ligand mediation in organic phosphorus cycling. *Soil and Biology*. 22: 75-102
- Díaz, D., De la Sen, A. (2011). Sistemas de *quorum sensing* en bacterias. *Reduca (Biología)*, 3(5).
- El-Tarabily, KA, Nassar, AH y Sivasithamparam, K. (2008). Promoción del crecimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en un suelo calcáreo mediante un

aislado de *Micromonospora endolithica* solubilizador de fosfato y competente en la rizosfera. *Ecología del suelo aplicada*, 39 (2), 161-171.

Fernandez, L., Zalba, P., Gomez, M., y Sagardoy, M. (2005) Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del suelo*. Vol. 23(1), 31-37.

Fernández, M. (2007). Fósforo: amigo o enemigo. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 41(2), 51-57.

Ferrera, R. y Alarcón, A. (2007) *Microbiología Agrícola, hongos, bacterias y micro y macrofauna, control biológico y planta – microorganismo*. Editorial Trillas. México. 568 p

Flores, M., Bautista, A., Aragón, F., y Martínez, V. (2018). Coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato y su efecto en la germinación y desarrollo del frijol. *INTERCIENCIA*. Vol.43. N°2. 137-143 p.

Gonzalez, T., Mendoza, F., Covarrubias, J., Moran, N., y Acosta, J. (2008). Rendimiento y calidad de la semilla de frijol en dos épocas de siembra en la región del Bajío. *Agricultura Técnica en México*. 34:421-430 p.

Habib, Y. (2010) Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los ríos otún y la vieja. [Trabajo de grado presentado como requisito Final para optar al título de Magister Scientiae en Microbiología]. Universidad Nacional de Colombia.

Lara, C., y Negrete, J. (2015) Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (*Dichanthium aristatum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 121-129. Epub July 13, 2021. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50741>

López, F., Muñoz, D., Hernández, M., Soler, A., Castillo M., y Hernández, I., (2003) Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la subcuenca de Zapotitlán de las

Salinas, Puebla. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana. UNAM. Vol. 56. N° 1. 19-41 p.

López, J., Toro, C., y López, D. (2004) Seasonality of organic phosphorus mineralization in the rhizosphere of the native savanna grass, *Trachypogon plumosus*. Soil Biology and Biochemistry. 36: 1675-1684 p.

Martínez, L., Martínez, R., Hernández, M., Arvizu, S., y Pacheco, J. (2013) Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Revista fitotecnia mexicana, 36(1), 63-69 p.

Morales, H. (2012). Aislamiento y Caracterización de Fosfobacterias. [Tesis de licenciatura en biología]. Querétaro, México.

Muñoz, D., Soler, A., López, F., Hernández, M. (2013) Edafología. UNAM, FES Iztacala; Primera edición. ISBN: 978-607-02-3877-2

Negassa, W., y Leinweber, P. (2009) How does the Hedley sequential phosphorus fractionation reflect impacts of land use and management on soil phosphorus: A review. J. Plant Nutrition and Soil Science. 172: 305-325 p.

Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2019). Streptomyces: implications and interactions in plant growth promotion. Applied microbiology and biotechnology, 103, 1179-1188.

Patiño, C., Sánchez, M. (2014). Efecto de la aplicación de roca fosfórica y la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el crecimiento del ají (*Capsicum annum*). Acta agronómica. Vol 63, num 2, pp1-13.

Peña, C., Trejo, C., Celis, R., y López, A. (2013) Reacción del frijol silvestre (*Phaseolus vulgaris* L.) a la profundidad de siembra. Revista de Ciencias Agrícolas 4:89-102 p.

Prada, L. (2013) Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los andes orientales colombianos. [Tesis, Posgrado De Microbiología] Bogotá - Colombia.

Pérez, E., Sulbaran, M., Balla, M., y Yarzabal, L. (2007) Isolation and characterization of mineral phosphate – solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south – easterns Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 39: 2905-2914 p.

Quiroga, C. (2015). Efecto de la co-inoculación de diferentes bacterias de suelo en la tasa fotosintética y el crecimiento de plantas de tomate cherry (*Lycopersicon esculentum Mill*). EcoFiv. Universidad Nacional de Bogotá.

Ramírez, T. (2009) Efectos de agroquímicos en las propiedades físico – químicas y biológicas en suelos del Táchira – Venezuela. Monografía de grado. Informe de Especialidad en Química Ambiental. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga – Colombia. 106 p.

Restrepo G., Marulanda S., Días A., Luisa, V., y Hernández, 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*. vol. 46, núm. 1, enero-abril, 2015, 63-76 p.

Rueda E., Barrón J. y Hallmann J. (2009) Bacterias promotoras del crecimiento vegetal. 1ra edición. 144 p.

Shiferaw, D., Diriba, M., y Gezahegn, B, (2013) Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on Seed Germination and Seedling Growth of Faba Bean (*Vicia faba L.*). *International Journal of Agricultural Research*, 8: 123-136 p.

Tapia, Y., y García, F. (2013) La disponibilidad de fósforo es producto de la actividad bacteriana en el suelo en ecosistemas oligotróficos: una revisión crítica. *Terra latinoamericana* 31. 231-242 p.

Valero, N. (2003). Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfato asociadas al cultivo de arroz (*Oriza sativa*). [Tesis de Maestría] Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 92 p.

Vargas, S. (2012) Microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.

White, P., y Hammond, J. (2008) Phosphorus nutrition of terrestrial plants. The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions, Vol. 7 Springer Netherlands. 51-81 p.

Wisuma, M, (2003), "How do plants achieve tolerance to phosphorus deficiency? Smallcauses with big effects", Plants Physiology, Vol.133.