

Aislamiento y Caracterización de Fosfobacterias

HORACIO CLAUDIO MORALES TORRES

DR. JUAN CAMPOS GUILLÉN

Departamento de Epidemiología y Biología Molecular de Parásitos
y Microorganismos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

campus Juriquilla

Santiago de Querétaro, Qro.

DR. VÍCTOR OLALDE PORTUGAL

Departamento de Bioquímica y Biotecnología

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS

AVANZADOS DEL IPN Unidad Irapuato

hoclamoto@yahoo.com

13 de febrero de 2012



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FOSFOBACTERIAS
TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

Horacio Claudio Morales Torres

Dirigido por:

Juan Campos Guillén

y

Víctor Olalde Portugal

SINODALES

Presidente

Firma

Secretario

Firma

Vocal

Firma

Suplente

Firma

Suplente

Firma

Nombre y Firma
Director de la Facultad

Nombre y Firma
Director de Investigación y
Postgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
13 de febrero de 2012
México

Resumen

Nutricionalmente, el fósforo es el segundo elemento más importante para el crecimiento y desarrollo vegetal, después del nitrógeno. Los fertilizantes químicos no suelen proveer suficiente fósforo pues gran parte se precipita como compuestos insolubles que la planta no puede asimilar, razón por la que se han considerado estrategias como la aplicación de inoculantes bacterianos que solubilicen este elemento en el suelo. En este trabajo se aislaron y caracterizaron cepas bacterianas capaces de solubilizar compuestos inorgánicos insolubles de fósforo para hacer disponible el elemento para las plantas. En la evaluación se consideraron rasgos morfológicos de las cepas, su habilidad para aprovechar 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato como única fuente de nitrógeno y su capacidad para solubilizar fósforo en medio con sales insolubles del elemento. También se evaluaron sus efectos sobre dos cultivos bajo diferentes condiciones del sustrato y coinoculados con hongos micorrícicos, en invernadero. Los experimentos consistieron en arreglos factoriales completamente al azar. Los resultados mostraron que la mayoría de las cepas pudieron aprovechar el ACC como fuente de carbono así como solubilizar fósforo en un medio con sales insolubles. Algunas de las cepas evaluadas tuvieron efectos de promoción de crecimiento en ambos modelos vegetales y principalmente alteraron la distribución de la biomasa en la planta. También se observaron cepas que interactaron sinérgicamente con hongos micorrícicos promoviendo el crecimiento de la raíz.

(Palabras clave: fósforo, bacterias solubilizadoras, ACC, hongos micorrícicos, sorgo, lechuga)

Summary

Nutritionally, phosphorus is the second element in importance for the plant growth and development. Chemical fertilizers can not supply enough phosphorus because an important amount precipitates in form of insoluble inorganic compounds which plants can not assimilate. In this work bacterial strains that can solubilize phosphorus insoluble compounds were isolated and characterized. For the bacteria, morphological features, ability to use 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) as sole nitrogen source and ability to solubilize phosphorus with insoluble salts of the element were considered. The effect of the strains on two crops under different conditions of substrate and coinoculated with micorrhizal fungi, in greenhouse, was also evaluated. Experiments were designed as completely randomized factorial arrangements. Results showed that most of the strains could use ACC as sole carbon source and solubilize phosphorus from media with insoluble salts. Some of the evaluated strains promoted growth on both plant models mainly altering the biomass distribution. It was also observed that some strains interacted synergistically with the micorrhizal fungi promoting root growth.

(Key words: phosphorus, solubilizing bacteria, ACC, micorrhizal fungi, sorghum, lettuce)

Dedicatoria

- A todo esfuerzo que pretenda alcanzar una mayor comprensión.
- A mi padre que tanto esperó la conclusión de este trabajo.
- A todos los miembros del laboratorio de bioquímica ecológica.

Agradecimientos

- Al SNI, por el apoyo económico que facilitó la elaboración de este trabajo.
- Al CINVESTAV Irapuato, porque gracias a su infraestructura y personal facilitó la elaboración de este trabajo.
- Dr. Víctor Olalde Portugal, por la oportunidad y confianza que me prestó.
- Dr. Juan Campos Guillén, por su apoyo en la elaboración del escrito y del proceso de titulación.
- Al Dr. Jorge Molina, por su comentarios y recomendaciones de redacción.
- Al Dr. Alexander de Luna y su estudiante Emiliano Izquierdo por las facilidades prestadas para el análisis espectrofotométrico.
- M. en C. Argel Gastelum por su apoyo y consejos sinceros en el análisis y en la elaboración del escrito.
- M. en C. Heriberto por las observaciones y recomendaciones en el análisis de los datos.
- M. en C. María Isabel Notario Zacarías por la confianza y amor que depositó en mí como individuo.
- Margarita Pérez Rizo por el ánimo que posee, que me sirvió de ejemplo muchas veces.
- Jesús Cuahtémoc Barrón Losoya, por sus observaciones y recomendaciones respecto de la redacción.
- A mi familia, porque es un fuerte pilar, lleno de amor y comprensión.
- En general, a todas las personas implicadas directa o indirectamente con la elaboración de este trabajo.

Muchas gracias.

Índice general

Resumen	I
Summary	II
Dedicatorias	III
Agradecimientos	IV
Índice general	IV
Índice de Cuadros	VIII
Índice de Figuras	IX
I Introducción	1
I.1 Justificación	2
II Revisión de literatura	3
II.1 El fósforo	3
II.1.1 Ciclo del fósforo	3
II.1.2 Importancia biológica del fósforo	4
II.1.3 El Fósforo en la agricultura	5
II.2 Bacterias promotoras	7
II.2.1 Bacterias solubilizadoras de fosfatos	8
II.2.1.1 Mecanismos de solubilización de fosfatos insolubles	9
II.2.1.2 Bacterias de apoyo micorrízico	11
III Hipótesis y Objetivos	13
III.1 Hipótesis	13
III.2 Objetivos	13

V.2.4.2.2	Biomasa de vástago.	52
V.2.4.2.3	Biomasa total.	55
V.2.4.2.4	Volumen radical.	55
V.2.4.2.5	Índice Raíz/Vástago.	55
V.2.4.2.6	Discusión.	55
V.3	Discusión general	60
	Bibliografía	61

Índice de Cuadros

Cuadro IV.1	Volúmenes de los reactivos usados en la preparación de las soluciones para la curva patrón de fósforo.	23
Cuadro IV.2	Variables consideradas en los ensayos de invernadero	26
Cuadro IV.3	Arreglo factorial del ensayo de sorgo	28
Cuadro IV.4	Arreglo factorial del ensayo de lechuga	29
Cuadro V.1	Morfología de las colonias de las cepas seleccionadas	32
Cuadro V.2	Morfología microscópica de las cepas	33
Cuadro V.3	Abreviatura de factores e interacciones del ensayo de sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	34
Cuadro V.4	Abreviatura de factores e interacciones del ensayo de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>).	52

Índice de Figuras

Figura IV.1	Procedimiento general para el montaje del método de azul molibdeno. . .	21
Figura V.1	Gráfica de solubilización <i>in vitro</i> de fósforo, primer ensayo	35
Figura V.2	Gráfica de solubilización <i>in vitro</i> de fósforo, del segundo ensayo	36
Figura V.3	Medias de biomasa de raíz (sorgo)	39
Figura V.4	Medias de biomasa de vástago (sorgo)	40
Figura V.5	Medias de biomasa (sorgo)	43
Figura V.6	Medias del índice Raíz/Vástago (sorgo)	44
Figura V.7	Medias de conductancia molar (sorgo)	47
Figura V.8	Medias de la tasa fotosintética (sorgo)	48
Figura V.9	Medias de biomasa de raíz (lechuga)	53
Figura V.10	Medias de biomasa de vástago (lechuga)	54
Figura V.11	Medias de biomasa total (lechuga)	57
Figura V.12	Medias del volumen radical (lechuga)	58
Figura V.13	Medias del índice Raíz/Vástago (lechuga)	59

I. Introducción

El crecimiento y desarrollo de los seres vivos depende de la incorporación de varios elementos a sus procesos biológicos y estructuras. El fósforo es el segundo macronutriente más importante, después del nitrógeno. Forma parte de la estructura de numerosas moléculas de importancia metabólica, genética, así como de señalización y estructura por lo que una deficiencia puede provocar trastornos en el desarrollo (Dietz y Foyer, 1986; Foyer y Spencer, 1986; Villet *et al.*, 1998). Las plantas adquieren el fósforo por sus raíces y su disponibilidad en el suelo depende de varios factores. En general, es un elemento poco accesible debido al tipo de ciclo biogeoquímico que presenta, en el que los reservorios son rocas fosfatadas de naturaleza insoluble (Arzuaga *et al.*, 2005; Cajuste, 1980). Así mismo en el suelo se presenta en concentraciones tan bajas que se convierte en un factor limitante para el crecimiento vegetal (Arcand y Schneider, 2006; Bielecki, 1973; Fernández *et al.*, 2005; Goldstein, 1994). Aunque pueden tomarse muchas estrategias para hacer disponible este elemento para las plantas, la mayoría implica la aplicación de fertilizantes fosfatados, cuyo uso excesivo ha mostrado tener consecuencias poco amigables para el medio ambiente local e incluso para ecosistemas alejados del sitio donde se hizo la aplicación (Adesemoye *et al.*, 2009; Bashan, 1998).

Entre los fertilizantes existen los denominados biofertilizantes, que se caracterizan por contener microorganismos que tienen un efecto de promoción en el crecimiento y desarrollo de la misma, razón por la que se las llama rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal o PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*). Estos efectos pueden deberse a que aumentan la disponibilidad de nutrientes para la planta hospedera o a que facilitan la colonización de la misma por parte de otros microorganismos benéficos. Algunas PGPRs hacen disponible el fósforo de compuestos insolubles que normalmente estaría fuera del alcance de la absorción vegetal. A estas se las denomina bacterias solubilizadoras de fosfatos. Al aumentar la disponibilidad de un elemento que resulta limitante para el crecimiento vegetal, estas bacterias tienen un efecto benéfico sobre las plantas que colonizan y su aplicación puede contribuir a un manejo más eficiente del fósforo. Ese detalle es importante en las prácticas agrícolas de países *en desarrollo* ya que, al ser de baja inversión, dificultan la adquisición de fertilizantes, plaguicidas y maquinaria agrícola. Los recursos financieros del agricultor individual en un

sistema de granja familiar también son bajos y los préstamos bancarios escasos. Eso explica que las cosechas crecidas en granjas familiares de países *en desarrollo* son, con frecuencia, mucho más reducidas que aquellas obtenidas en condiciones experimentales: la baja fertilidad caracteriza a la agricultura de subsistencia (Bashan, 1998).

I.1. Justificación

Ya que una parte primordial de la actividad agrícola es brindar al cultivo los nutrientes necesarios para su óptimo desarrollo, algunos autores abordan el asunto proponiendo el empleo de microorganismos para la adquisición y optimización en el uso de nutrientes por la planta (Adesemoye *et al.*, 2009), aunque esta práctica no es nueva (Bashan, 1998). Bashan (1998) señala la importancia de encontrar la *mejor* bacteria disponible si se considera la opción de inocular un cultivo con bacterias benéficas. Dadas las condiciones de bajas concentraciones de fósforo soluble en suelos de naturaleza calcárea o aquellos que recién se forman a partir de la roca ígnea, cabría esperar que en ellos se presenten poblaciones bacterianas con la capacidad de tolerar no sólo las condiciones de deficiencia, sino además, de aumentar la disponibilidad del elemento en forma efectiva, como señalan Zhu *et al.* (2007) y Jorquera *et al.* (2008).

Dado el potencial que presenta para México el desarrollo y aplicación de esta tecnología para mejorar la producción agrícola resulta justificado el aislamiento y evaluación de microorganismos capaces de optimizar los procesos de fertilización en la agricultura, más aún cuando en nuestro país, las condiciones socioeconómicas no favorecen el uso extensivo de fertilizantes químicos por la mayor parte de la población dedicada a esta actividad productiva. Así mismo, aislar microorganismos de suelos que, de forma natural, presentan condiciones de deficiencia de fósforo soluble, puede proveer de material biológico apropiado para el desarrollo de fórmulas que contribuyan a un mejor aprovechamiento de este elemento.

Por eso, en el presente trabajo se aislaron bacterias solubilizadoras de fósforo aisladas de la rizósfera de suelos calcáreos y se caracterizaron junto con bacterias procedentes de rizósferas de suelos ígneos, agrícolas y de bosque de encino. La caracterización incluyó rasgos morfológicos tanto macro como microscópicos, la habilidad para solubilizar *in vitro* fuentes insolubles de fósforo inorgánico y la habilidad para metabolizar 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato como única fuente de nitrógeno. También se montaron ensayos en invernadero, usando sorgo y lechuga, para determinar *in vivo* si la aplicación de las cepas producía efectos de promoción de crecimiento y si existía interacción con otros microorganismos benéficos. Dichos efectos se midieron en función de variables agronómicas y fisiológicas medidas en los modelos vegetales.

II. Revisión de literatura

II.1. El fósforo

En la tabla periódica, el fósforo, cuyo símbolo es P, se clasifica como un no metal. Fue descubierto en 1669 por Henning Brand, un comerciante y alquimista alemán. El nombre proviene del griego “phos”=luz y “phoros”=el que lleva. Este elemento puede existir en varios estados de oxidación, que varían del -3, como en la fosfina (PH_3), hasta el estado oxidado +5, del ortofosfato (PO_4^{-3}). En la naturaleza se presenta en minerales de la familia de las apatitas: $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{CaX}_2$, donde X= F, Cl u OH, que son componentes principales de la roca fosforada amorfa (Cotton y Wilkinson, 1976).

Aunque se ha prestado poca atención a las transformaciones inorgánicas del fósforo, en comparación con el nitrógeno, hay algunas evidencias de cambios catalizados biológicamente en el estado de oxidación de este elemento. Cuando se agrega fosfito (una forma reducida de fósforo: PO_3^{-3}) al suelo, su concentración tiende a disminuir, mientras que la del fosfato (PO_4^{-3}) tiene un incremento. Esta oxidación es meramente biológica dado que deja de ocurrir cuando se adiciona un inhibidor biológico, como el tolueno. Los microorganismos en el suelo pueden utilizar ambas formas de fósforo, pero las bacterias utilizan preferentemente el PO_4^{-3} (Cotton y Wilkinson, 1976; Martin, 1980).

II.1.1. Ciclo del fósforo

Se considera que el elemento es de ciclo cerrado, también llamado sedimentario, porque sus mayores depósitos o reservorios, se encuentran en forma de rocas fosfóricas. A diferencia de otros elementos, como el nitrógeno que tiene su reservorio en la atmósfera, el fósforo presenta un ciclo muy lento y para que algunos depósitos sean accesibles a las plantas y otros organismos se requieren levantamientos geológicos que expongan las rocas fosfóricas a la erosión. Estas rocas son minerales primarios y secundarios como la variscita, strengita, hidroxiapatita, fluorapatita y fosfatos di y tricálcicos. El intemperismo, es decir la erosión eólica e hídrica, así como la acción de microorganismos solubilizadores de fosfato inorgánico

liberan el fósforo a la solución soluble del suelo. Es allí donde muchos microorganismos y plantas lo absorben e integran a sus estructuras biológicas. Al morir, la materia orgánica de cualquier organismo se convierte en un reservorio de fósforo que, mediante la acción de enzimas fosfatasa microbianas, es liberado nuevamente a la solución del suelo. Este proceso se llama mineralización (Arzuaga *et al.*, 2005; Cajuste, 1980; Vilee *et al.*, 1998).

Al ser absorbido por plantas o microorganismos, al morir éstos, al solubilizarse por intemperismo o por acción microbioana a partir de materia orgánica e inorgánica y al precipitar en formas insolubles, el fósforo se mueve en el ecosistema. En el ecosistema marino también existe un reciclaje del fósforo ya que los organismos mantienen este elemento circulando gracias a que migran a lo largo de la columna de agua. El fósforo en solución es absorbido por algas y otros organismos que conforman el plankton. La fracción que llega a la zona bentónica, también llamada piso oceánico, es aprovechado por los organismos de las profundidades. Una parte de este elemento es llevado, de nuevo, cerca de la superficie gracias a las migraciones en la columna de agua. Las aves marinas llevan parte del fósforo de estos ecosistemas tierra adentro, donde los microorganismos son los principales movilizados este elemento (Cajuste, 1980; Madigan *et al.*, 2006; Vilee *et al.*, 1998).

II.1.2. Importancia biológica del fósforo

Numerosas estructuras de los seres vivos presentan fósforo. Se encuentra en el ácido desoxirribonucleico, ADN, y el ácido ribonucleico, ARN, formando parte del esqueleto de la cadena de nucleótidos. Está presente en la estructura de los fosfolípidos, los cuales son esenciales en la composición de las membranas celulares. Agregar un fosfato a un compuesto particular lo *energiza* facilitando varias reacciones químicas vitales para el metabolismo celular. También se encuentra en un tipo particular de nucleótidos que participan en tales reacciones de transferencia de energía, de los cuales el de adenosina es el más abundante: el trifosfato de adenosina, ATP (*adenosine triphosphate*). El monofosfato de adenosina, AMP (*adenosine monophosphate*), actúa como una molécula señalizadora que regula varios procesos celulares. Otros nucleótidos importantes en las reacciones de obtención de energía son el dinucleótido de nicotinamida y adenina, NAD⁺ (*nicotinamide adenine dinucleotide*), el fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina, NADP⁺ (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) que tiene una estructura muy similar al NAD⁺ pero con un fosfato extra que no participa de manera directa en la transferencia de energía y el dinucleótido de flavina y adenina, FAD (*flavin adenine dinucleotide*) (Vilee *et al.*, 1998).

Existen algunos trabajos que evidencian la importancia del fósforo en la fisiología de las plantas. Por ejemplo, Foyer y Spencer (1986), encontraron que la deficiencia de fósforo en la fertilización de cebada, espinaca y soya estuvo relacionada con una disminución significativa

del fósforo inorgánico foliar, de la tasa fotosintética y de la proporción sacarosa/almidón en las hojas. La tasa fotosintética se refiere a la captación o fijación de CO₂ por la planta. Los autores destacaron que ésta se vio inhibida en las plantas a las que no se suministró fósforo.

Siguiendo una línea similar Dietz y Foyer (1986) estudiaron las relaciones entre la concentración de fósforo insoluble foliar, la fijación de CO₂ y los niveles de metabolitos fosforilados en espinaca y en cebada. Encontraron que la tasa fotosintética fue inhibida en plantas con deficiencia de fósforo y que, conforme más prolongada fuera ésta, más severa era la inhibición. En las hojas, los metabolitos fosforilados estaban en bajas concentraciones como resultado de la deficiencia de Pi.

En otro estudio, esta vez de campo, Raaimaker *et al.* (1995) encontraron respuestas similares a la escasez de fósforo. Los autores estudiaron un bosque lluvioso en Guyana, con suelos ácidos bajos en fósforo, para determinar si la disponibilidad de este elemento limita la fotosíntesis de los árboles en ese ecosistema, en mayor grado que el nitrógeno. Encontraron que el contenido de fósforo foliar tuvo mayor influencia sobre la capacidad fotosintética que el contenido de nitrógeno foliar. También determinaron que la capacidad fotosintética dependió más del contenido de fósforo y nitrógeno que de la cantidad de luz.

A nivel nutrimental, la importancia del fósforo para los seres vivos radica en los procesos que desempeñan las moléculas de los que forma parte. Particularmente, el metabolismo vegetal depende en gran medida de este elemento debido, en parte, a su papel en reacciones de transferencia de energía.

II.1.3. El Fósforo en la agricultura

El crecimiento y desarrollo vegetal se ve limitado principalmente por nitrógeno y después por fósforo debido a la presencia de estos elementos en el suelo (Fernández *et al.*, 2005; Kochian *et al.*, 2004; Rodríguez y Fraga, 1999). En el suelo, Rodríguez y Fraga (1999) mencionan que el fósforo total se presenta en niveles que van de 400 a 1200 mg_{fósforo}/kg_{suelo}, mientras que Cajuste (1980) señala que los niveles tienen un rango mayor: de 200 a 5000 mg_{fósforo}/kg_{suelo}. El fósforo asimilable por las plantas se presenta en la solución del suelo en forma de aniones ortofosfato, predominantemente H₂PO₄⁻ y HPO₄⁻². En posteriores menciones, se considerará fosfato inorgánico u ortofosfato al anión H₂PO₄⁻, aunque el término es más amplio. El nivel fósforo asimilable es menor que el de fósforo total: Bielecki (1973) menciona que, típicamente, la solución del suelo contiene ≈ 0.063 mg_{fósforo}/L y Goldstein (1994) afirma después que, en suelos fértiles, las concentraciones de este tipo de fósforo, en la solución del suelo, raramente superan 0.319 mg_{fósforo}/L. Fernández *et al.* (2005) señalan que el rango va desde 5 a 30 mg_{fósforo}/kg_{suelo} y Arcand y Schneider (2006) parecen coincidir al señalar que sólo del 1 al 5 % del fósforo total está disponible para la asimilación vege-

tal, es decir, tomando los valores menos conservadores de Cajuste (1980), el rango va de 2-10 mg_{fósforo}/kg_{suelo} (1 %) hasta 50-250 mg_{fósforo}/kg_{suelo} (5 %). Esta información parece contradictoria pues los primeros dos autores mencionan un valor mucho menor. Bielecki (1973) menciona que el dato que provee deriva de muestreos hechos en los Estados Unidos y Goldstein (1994) también hace referencia a los suelos de ese país. Por su parte, Fernández *et al.* (2005) hicieron su estudio en territorio argentino por lo que es posible que el dato se obtuviera a partir de muestras de ese país. Las diferencias también pueden deberse a los métodos usado por los autores para determinar la concentración de fósforo insoluble. Aún así, todos coinciden en que se trata de un elemento limitante en el suelo.

La baja disponibilidad se debe a que algunas sales de fósforo son poco solubles bajo ciertas condiciones de pH y a que algunos elementos en el suelo pueden fijarlo, extrayéndolo así de la fracción soluble. Estas deficiencias en la disponibilidad de fósforo limitan la producción agrícola. La situación se agrava en sitios donde los fertilizantes convencionales están inaccesibles (Arcand y Schneider, 2006; Bashan, 1998; Bielecki, 1973; Cajuste, 1980; Fernández *et al.*, 2005; Kochian *et al.*, 2004; Rodríguez y Fraga, 1999).

Los fenómenos de fijación y precipitación del fósforo son altamente dependientes del pH y del tipo de suelo, Cajuste (1980) afirma que incluso la temperatura afecta la disponibilidad de este elemento. En suelos ácidos el fósforo es fijado por óxidos libres e hidróxidos de aluminio y hierro, mientras que en suelos alcalinos se precipita como sales de calcio (Anónimo, 1999; Rodríguez y Fraga, 1999).

Aún así, la mayor parte de los suelos agrícolas contienen reservas grandes de este elemento, aunque en forma insoluble, y de ellas, una cantidad respetable es consecuencia de la aplicación regular de fertilizantes fosfatados (Rodríguez y Fraga, 1999). Por poner un ejemplo, Barraco *et al.* (2007) evaluaron dos formas de aplicación de fósforo como fertilizante y tres niveles de aplicación en cultivos de maíz de diferentes localidades de la Pampa argentina, a saber: 11, 22 y 44 kg_{fósforo}/ha. Sin embargo, las aplicaciones pueden ser mayores. En las prácticas agrícolas extensivas manejan grandes cantidades de fertilizantes químicos convencionales que son costosos y tienen efectos adversos sobre los mantos acuíferos, cuerpos de agua superficiales, ecosistemas locales e incluso regionales (Adesemoye *et al.*, 2009; Bashan, 1998).

También hay información que indica que los fertilizantes convencionales tienen poca eficiencia de uso pues sólo una porción de los nutrientes aplicados son absorbidos por las plantas (Fernández *et al.*, 2005). Por citar un ejemplo, Cajuste (1980) menciona que sólo del 10 al 15 % del fósforo aplicado anualmente, es aprovechado por el cultivo, y Rodríguez y Fraga (1999) señalan que fertilizantes como el súper fosfato contienen calcio suficiente como

para precipitar más de la mitad de su propio fósforo en forma de fosfato dicálcico o fosfato dicálcico dihidratado.

Arzuaga *et al.* (2005), Madigan *et al.* (2006) y los autores antes citados observan que, dado que el metabolismo microbiano es capaz de liberar el fósforo atrapado en compuestos insolubles, resulta importante considerar el uso de microorganismos para aprovechar eficientemente este elemento.

II.2. Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal

La rizósfera es el volumen de suelo que rodea a las raíces y que está influenciado química, física y biológicamente por las raíces de la planta (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Madigan *et al.*, 2006). Las raíces vegetales secretan gran cantidad de azúcares (del 5 al 21 % del carbono que fijan), así como aminoácidos, hormonas, vitaminas y ácidos orgánicos (Lugtenberg y Kamilova, 2009), lo que genera un ambiente adecuado para la proliferación de muchos microorganismos (Madigan *et al.*, 2006; Podile y Kishore, 2006).

Los microorganismos que colonizan la rizósfera pueden ser parasíticos, de vida libre o saprófitos y su diversidad es dinámica, con cambios en la estructura y abundancia de especies (Podile y Kishore, 2006). Una fracción importante de los microorganismos asociados a rizósfera beneficia a las plantas que coloniza ya que estimula su crecimiento y desarrollo además de prevenir la colonización de microorganismos que afecten su salud. En el trabajo de Kloepper y Schroth (1978), los autores acuñaron el término PGPR a las bacterias que tienen ese tipo de efectos (Podile y Kishore, 2006; Rodríguez y Fraga, 1999). Se puede definir a las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, en términos muy generales, de la siguiente forma: microorganismos bacterianos que habitan la rizósfera y que, por diferentes mecanismos, tienen un efecto benéfico en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Madigan *et al.*, 2006; Podile y Kishore, 2006; Rodríguez y Fraga, 1999). Sin embargo, estos efectos pueden ser específicos para ciertas plantas hospederas.

Las PGPRs pueden beneficiar a su anfitrión mediante mecanismos que pueden clasificarse en dos categorías según el efecto que tiene sobre el hospedero:

La directa es en la que la rizobacteria aumenta la adquisición de nutrientes de la planta, tales como el fósforo, el nitrógeno, el potasio, etc. o la estimula a nivel hormonal (Kang *et al.*, 2010; Loon, 2007; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Podile y Kishore, 2006; Saleem *et al.*, 2007).

La indirecta es en la que la rizobacteria elimina el efecto nocivo de un patógeno en la planta por mecanismos que van desde la competencia con el patógeno por nutrientes hasta

la inducción, en la planta, de respuestas de resistencia contra el mismo (Kang *et al.*, 2010; Loon, 2007; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Podile y Kishore, 2006; Saleem *et al.*, 2007).

Un ejemplo de promoción por la vía directa es la regulación de los niveles de etileno dentro de la planta. El etileno tiene varios efectos durante la vida de una planta, pero en condiciones de estrés abiótico y/o biótico sus efectos suelen ser adversos para el crecimiento y el desarrollo. En cualquier condición de estrés la planta tiende a aumentar la concentración de etileno, tanto fuera como dentro de ella, mediante una ruta metabólica en la que el 1-aminociclopropano-1-carboxilato, ACC es oxidado formando etileno, CO₂ y cianuro. Se han aislado rizobacterias que tienen la habilidad de degradar el ACC con lo que no sólo evitan que los niveles de etileno crezcan sino que además obtienen una fuente adicional de nitrógeno (Glick y Penrose, 2004; Kausar y Shahzad, 2006). La enzima bacteriana que degrada el ACC se llama ACC-*desaminasa* y la reacción que cataliza produce α -cetobutirato y amonio.

Aunque la habilidad de solubilizar el fósforo y la de degradar el ACC *in vitro* pueden considerarse como rasgos de promoción, Cattelan *et al.* (1999), afirman que eso no garantiza que se trate de una PGPR. En sus resultados observaron que rizobacterias capaces de producir ACC desaminasa y, en menor grado, β -1,3-glucanasa, sideróforos o aquellas capaces de solubilizar fósforo *in vitro*, pueden aumentar el crecimiento temprano de soya en suelo no estéril.

Los resultados de Figueiredo *et al.* (2008) sugieren que las PGPRs tienen mejores efectos en asociación con otras bacterias, a lo que se denomina consorcio. Los autores encontraron evidentes ventajas en el uso de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* coinoculadas con *Rizobium tropici* ya que la combinación produjo una mayor acumulación de nitrógeno en la planta gracias a la estimulación de la nodulación, que permitió un aumento en la fijación de nitrógeno.

Posteriormente, los resultados de Adesemoye *et al.* (2009), cuyo trabajo se enfocó al tema de la optimización de nutrientes, mostraron que los consorcios produjeron un crecimiento y cosecha mayores con una menor aplicación de fertilizantes. La evidencia que obtuvieron pareció soportar su hipótesis de que los consorcios pueden permitir una reducción en los suministros de nitrógeno, fósforo y potasio.

II.2.1. Bacterias solubilizadoras de fosfatos

Existen numerosos trabajos que han examinado la habilidad de diferentes especies bacterianas y fúngicas para solubilizar compuestos de fósforo inorgánicos que son insolubles, y por tanto, no asimilables por la planta. Entre los géneros bacterianos que se sabe pueden solubi-

lizar fosfatos inorgánicos de baja solubilidad podemos mencionar a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Aerobacter*, *Enterobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus* y *Erwinia* (Rodríguez y Fraga, 1999; Vassilev *et al.*, 2006). Debido al rico ambiente que presenta la rizósfera, es allí donde encontramos las mayores concentraciones de este tipo de bacterias, en comparación con suelos que están fuera de ella (Arcand y Schneider, 2006; Fernández *et al.*, 2005).

En varios trabajos se han aislado y caracterizado bacterias solubilizadoras de fósforo provenientes de rizósfera de diversas especies vegetales. Por ejemplo Fernández *et al.* (2005) estudiaron la habilidad, para solubilizar fosfatos, de diferentes grupos bacterianos y cepas de *Bradyrhizobium* sp. aislados de suelos sojeros. Lo hicieron en función del tamaño de los halos que las cepas generaban al crecer en un medio con fosfatos insolubles como fuente de fósforo y del porcentaje de fosfato solubilizado en medio líquido.

También Jorquera *et al.* (2008) llevaron a cabo un aislamiento de fosfobacterias mineralizadoras y solubilizadoras de fósforo inorgánico de rizósferas de centeno, trébol, trigo, avena y lupino en suelos volcánicos y las seleccionaron con base en su capacidad para utilizar tanto fitato de sodio como fosfato de calcio en medio sólido. El estudio reveló que las plantas de pastura tienen, predominantemente, bacterias mineralizadoras, mientras que en cultivos predominan las bacterias solubilizadoras. Las cepas seleccionadas también mostraron una alta liberación de fósforo comparadas con suelos no inoculados. La adición de glucosa influyó la capacidad de algunas de las cepas para liberar el fósforo inorgánico a la fracción soluble.

Por su parte, Calvo-Vélez *et al.* (2008) evaluaron las poblaciones de microorganismos en rizósfera de papa en dos regiones altoandinas con características climáticas, edafológicas, manejo agrícola y de altitud diferentes. Concluyeron que las poblaciones microbianas en rizósfera pueden estar influenciadas por el pH, la altitud, la temperatura y el fósforo disponible. Observaron, por ejemplo, que la población de *Azotobacter* spp. se vio favorecida con la fertilización química de fósforo mientras que la de *Bacillus* spp. se vio afectada negativamente en suelos con dicha fertilización.

II.2.1.1. Mecanismos de solubilización de fosfatos insolubles

Los mecanismos que muchas bacterias emplean para solubilizar compuestos insolubles de fósforo son varios. El más estudiado ha sido la acidificación de la rizósfera mediante la secreción de ácidos orgánicos. A continuación se describen dichos mecanismos:

La acidificación del medio permite la liberación de fosfato en condiciones alcalinas, mediante sustitución del H^+ por Ca^{+2} . Algunos de los principales ácidos orgánicos producidos por bacterias solubilizadoras son el ácido glucónico y el ácido 2-cetoglucónico,

pero también se producen los ácidos láctico, isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, oxálico, malónico y succínico (Rodríguez y Fraga, 1999). Los ácidos orgánicos no son la única estrategia pues algunas bacterias liberan ácidos sulfúrico y nítrico producidos durante la actividad quimioautótrofa oxidante de amonio y azufre, como es el caso de bacterias del género *Thiobacillus* (Arcand y Schneider, 2006; Fernández *et al.*, 2005; Martin, 1980; Rodríguez y Fraga, 1999; Vassilev *et al.*, 2006).

La excreción de H^+ , protones que participan en la sustitución del Ca^{+2} con lo que se libera el fosfato de las apatitas, por ejemplo. Al respecto, hay evidencia de que este mecanismo está relacionado con la asimilación de cationes relacionados con la fuente de nitrógeno (Arcand y Schneider, 2006; Rodríguez y Fraga, 1999). Este mecanismo implica también una acidificación del medio, pero esta vez por excreción de protones.

La secreción de sustancias quelantes es otra manera en que las bacterias solubilizan el fósforo del sustrato. Los aniones de los ácidos orgánicos pueden solubilizar fósforo a través de reacciones de quelación, que son reacciones en las que se forman 2 o más enlaces coordinados entre moléculas aniónicas o polares, y un catión, resultando una estructura de anillo, también denominada *complejo*. Los aniones de ácidos orgánicos, con sus grupos hidroxilo y carboxilo, son capaces de formar complejos estables con cationes tales como el Ca^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , y Al^{+3} , que comúnmente están unidos con fosfato en compuestos insolubles (Arcand y Schneider, 2006).

Las reacciones de intercambio de ligandos favorecen la permanencia del fosfato en solución. Los ligandos compiten con el fósforo por los sitios de adsorción en las superficies cristalinas de $Fe(OH)_3$ y $Al(OH)_3$. Los aniones de ácidos orgánicos pueden deadsorber el fosfato de superficies minerales ya que lo extraen de su asociación con óxidos e hidróxidos de aluminio, hierro y calcio mediante la formación de complejos con estos metales (Kochian *et al.*, 2004). El citrato es el ácido que más favorece este intercambio ya que aumenta la disponibilidad de fósforo en suelos con pH ácidos (Arcand y Schneider, 2006) en los que la baja disponibilidad de fósforo se debe que los hidróxidos de hierro y aluminio capturan a dicho elemento (Rodríguez y Fraga, 1999).

Los ácidos orgánicos pueden actuar de diferentes formas para solubilizar el fósforo. La manera en que son excretados estos compuestos, como ácido o como anión, determina el mecanismo que la bacteria usa para solubilizar el fósforo en la rizósfera.

Hay que considerar que la capacidad para solubilizar fósforo no es excluyente de otros mecanismos de promoción de crecimiento. Una bacteria promotora de crecimiento puede

serlo gracias a diferentes mecanismos por los que beneficia a su hospedero vegetal. Existen cepas que además de ser capaces de solubilizar fósforo, también producen fitohormonas, sideróforos y además, presentan antagonismo con uno o varios patógenos de plantas (Rodríguez y Fraga, 1999).

II.2.1.2. Bacterias de apoyo micorrízico

Se han hecho observaciones de bacterias promotoras que interactúan sinérgicamente con hongos micorrízicos, por lo que se las denomina bacterias de apoyo micorrízico (*mycorrhizal helper bacteria*) (Rodríguez y Fraga, 1999).

Al respecto se puede mencionar la publicación de Azcón-Aguilar *et al.* (1986), en la que describen un estudio de las interacciones entre hongos micorrízicos (HM) y bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) utilizando el poco soluble ^{32}P - ^{45}Ca -fosfato tricálcico en *Glycine max* - *Rhizobium japonicum*, en un suelo calcáreo neutro. En los resultados, destaca que la infección del hongo micorrízico se vió incrementada cuando se coinoculaba con BSF en todos los tratamientos de fertilización.

En una publicación posterior, Toro *et al.* (1997) observaron resultados similares. Evaluaron el efecto interactivo de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y HMs en el uso vegetal de fósforo en suelos con baja disponibilidad del elemento. Encontraron que las rizobacterias se comportaron como bacterias de apoyo micorrízico ya que promovieron el establecimiento de los HM, tanto nativos como introducidos, aún y con la disminución poblacional de las bacterias en el suelo. También observaron que la coinoculación de *Glomus intraradices* y *Bacillus subtilis* incrementó significativamente la biomasa y la acumulación de nitrógeno y fósforo en los tejidos de la planta.

El mecanismo propuesto por el que las bacterias solubilizadoras de fosfatos contribuyen a una mayor formación de micorriza es el aumento el fósforo disponible en la rizósfera. Se sugiere que esto puede funcionar como un elemento quimiotáxico que estimula al hongo a infectar la raíz de la planta. Adicionalmente se favorece la explotación de fuentes insolubles de fósforo y se aumenta la absorción del mismo por la planta gracias al aumento en el área radical que genera el puente micorrízico (Adesemoye *et al.*, 2009; Rodríguez y Fraga, 1999; Vassilev *et al.*, 2006).

Con todo lo anteriormente expuesto y dado el potencial que representa para la agricultura el uso de microorganismos que mejoren la producción agrícola en condiciones de baja fertilidad a menor costo, se considera que el aislamiento y evaluación de microorganismos capaces de optimizar los nutrientes en el suelo parece un asunto que debiera atenderse y desarrollarse en México, más aún cuando las condiciones socioeconómicas no favorecen el

uso extensivo de fertilizantes químicos por la mayor parte de la población dedicada a esta actividad productiva (Adesemoye *et al.*, 2009; Bashan, 1998).

En este trabajo se retoma la idea de aislar microorganismos de suelos que, de forma natural, presentan condiciones de baja fertilidad (deficientes en fósforo soluble) (Zhu *et al.*, 2007). Esto puede proveer de material biológico apropiado para la elaboración de inóculos y/o fórmulas que favorezcan el crecimiento y desarrollo de los cultivos y contribuyan a un mejor aprovechamiento del elemento (Jorquera *et al.*, 2008).

III. Hipótesis y Objetivos

III.1. Hipótesis

La habilidad de solubilizar fosfatos inorgánicos insolubles se presentará en bacterias aisladas de suelos calcáreos deficientes en fósforo soluble. Estas bacterias también presentarán otros rasgos de promoción de crecimiento vegetal.

III.2. Objetivos

III.2.1. General

Aislar bacterias solubilizadoras de fosfatos de rizósfera, a partir de suelo con deficiencias de fósforo, para luego caracterizarlas, morfológica y fisiológicamente, así como en su capacidad para promover el crecimiento de plantas en invernadero.

III.2.2. Particulares

1. Aislar bacterias de suelos calcáreos que sean capaces de solubilizar sales inorgánicas insolubles de fósforo.
2. Seleccionar las cepas que presenten mayor capacidad para solubilizar fósforo con base en un método semi-cuantitativo.
3. Caracterizar morfológicamente las colonias y las células de las cepas seleccionadas.
4. Determinar cuantitativamente la capacidad que tienen para solubilizar el fósforo.
5. Determinar si las cepas pueden crecer en medio cuya única fuente de nitrógeno es el ACC.
6. Evaluar, mediante experimentos en invernadero, si las cepas aisladas interactúan con hongos micorrícicos y promueven crecimiento en plantas con metabolismos diferentes.

IV. Materiales y métodos

IV.1. Materiales

- Programa de análisis estadístico *R project for statistical computing* (Team, 2009) usando las librerías *R commander* (Fox *et al.*, 2009), *agricolae* (Mendiburu, 2010), *stats* y *car* (Fox y Weisberg, 2010)
- Programa *OpenOffice.org* versión 3.2.0 en modalidad de hoja de cálculo.
- Programa procesador de textos *TEXMAKER 3.0* y *TeX Live 2009*.
- Programa de análisis de imágenes *The Gimp* versión 2.6.7.
- Medio de fosfatos del *National Botanical Research Institute*, NBRIP: glucosa, 10 g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g; KCl, 0.2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 g; mezclado en 1000 mL de agua y en ese orden; en caso que quiera prepararse medio sólido se añaden, hasta el final, 17 g de agar bacteriológico. La solución se esteriliza en autoclave a $\approx 1.2 \text{ kg/cm}^2$, por 20 min. Cuando se vacía en caja Petri, se recomienda agitar el recipiente para mantener homogéneo el medio, pues el fosfato tricálcico tiende a precipitarse. En este punto pueden agregarse 0.005 g de azul de bromotimol. Se disuelve antes que solidifique el medio y se vierte en las placas.
- Caldo nutritivo: extracto de levadura, 2.5 g; peptona de caseína, 5 g; glucosa, 10 g; los reactivos se mezclaron en ese orden en 500 mL de agua destilada, luego se aforó hasta 1000 mL y se esterilizó en autoclave a $\approx 1.2 \text{ kg/cm}^2$ por 20 min.
- Medio de 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato, ACC: 4 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g glucosa, 2 g ácido glucónico, 2 g ácido cítrico, 1 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 μg H_3BO_3 , 11.19 μg $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 124.6 μg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 78.22 μg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 16.8 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 18 g agar bacteriológico. El medio se preparó de la siguiente forma:

1. Solución de elementos traza: se disuelven 10 mg H_3BO_3 , 11.19 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 124.6 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 78.22 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 16.8 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada, se esterilizan en autoclave ($\approx 1.2 \text{ kg/cm}^2$) por 20 minutos y se almacena a 4°C , así pueden durar varios meses.
 2. Solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: se disuelven 100 mg en 10 mL de agua destilada, se esteriliza en autoclave ($\approx 1.2 \text{ kg/cm}^2$) por 20 minutos y se almacena a 4°C , así puede durar varios meses.
 3. Se disuelven 4 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g glucosa, 2 g ácido glucónico, 2 g ácido cítrico, 0.1 mL de la solución de elementos traza, 0.1 mL de la solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 18 g de agar bacteriológico en 1000 mL de agua destilada. Se esteriliza en autoclave ($\approx 1.2 \text{ kg/cm}^2$) por 20 minutos. Si el medio se prepara disolviendo completamente un ingrediente por vez y en el orden en que se mencionan, no deberían presentarse precipitados. La fórmula omite la fuente de nitrógeno porque se agregará en forma de ACC.
 4. El ACC se agrega al medio solidificado con una solución estéril del compuesto obtenida mediante filtrado por membrana con diámetro de poro de $0.2 \mu\text{m}$. La solución se preparó con 33.36 mg de ACC disueltos en 11 mL de agua destilada estéril. Se aplicó 1 mL de la solución y se extendió con una varilla de vidrio para distribuirla hasta que el medio la absorbió. De esa forma las placas contuvieron aproximadamente $30 \mu\text{mol}$ de ACC.
- Esponja suave cilíndrica de 3 cm de diámetro.
 - Mondadientes estériles.
 - Cajas Petri desechables y de vidrio estériles.
 - Navaja o bisturí estéril.
 - Pinzas de disección estériles.
 - Agujas de disección estériles.
 - Solución de cloramina T al 2 %.
 - Tamiz con aperturas de 0.420 mm.
 - Tamiz con aperturas de 0.149 mm.
 - Tamiz con aperturas de 0.038 mm.

- Tubos marca Falcon de 50 mL.
 - Pipeta de vidrio de 10 mL.
 - Pipeta de vidrio de 1 mL.
 - Solución NH_4OH 4 N.
 - Solución HCl 4 N.
 - Solución 2,4-dinitrofenol al 0.25 % (p/v). Es una solución saturada del compuesto. Manéjese con precaución porque es tóxico.
 - Solución H_2SO_4 7 N.
 - Solución HCl 1.2 N.
 - Solución patrón de 50 ppm de fósforo. Se disuelven 0.2195 g de KH_2PO_4 , previamente secados a 40 °C, en 400 mL de agua destilada. Se añaden 25 mL de H_2SO_4 7N y se afora a 1 L. Se almacena en un recipiente de vidrio blando y no pirex para reducir a contaminación con arsénico. Se conserva indefinidamente.
 - Solución de ácido cloromolibdico al 1.5 %. Para 200 mL se hacen 2 soluciones:
 1. Se disuelven 3 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 60 mL de agua deionizada, calentando la solución a cerca de 50 °C para facilitararlo.
 2. Se disuelven 56 mL de HCl al 38 % que está 12.51 N en 14 mL de agua deionizada, agregando el ácido al agua, obteniendo una solución 10 N de HCl . Puede ser necesario mantener el recipiente en otro mayor, con agua, para evitar el aumento rápido de la temperatura.
- Ambas soluciones se mezclaron cuando estuvieron frías y se aforaron a 200 mL. Se puede almacenar por 2 meses aproximadamente dentro de un recipiente de vidrio blando y color ámbar.
- Solución de ácido cloroestañoso. 2 mL se preparan mezclando 0.05 g de $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0.1 mL de HCl al 38 %, se disuelve muy bien y se agregan 0.9 mL de agua desionizada. Finalmente se agrega 1 mL de HCl 1.2 N. Como es muy susceptible a la oxidación, la solución se preparó el día del ensayo y en volúmenes pequeños. Luego de algunas horas de exposición a la atmósfera produce resultados dudosos por lo que se usó hasta 4 h luego de haberse preparado.

- Ocular escalado periplano 10x/18 519749 marca Leitz Wetzlar Germany.
- Microscopio *Laborlux S* Ernst leitz wetzlar GMBH 512859.
- Espectrofotómetro Varian, modelo Cary 50.
- Microcentrífuga *Heraeus Biofuge stratos*.
- Balanza analítica marca *Sartorius GMBA Göttingen* Tipo: 1574 MP8-2.
- *Sistema de fotosíntesis portátil* LI-6200 con analizador infrarojo de gases LI-6250.
- Semillas de sorgo, (*Sorghum bicolor* L. Moench), variedad Temporal BJ83 Caloro, 2008.
- Plántulas de lechuga, (*Lactuca sativa* L.).

IV.2. Aislamiento

Se tomaron muestras de suelo de la localidad de *Valencianita*, municipio de Irapuato, estado de Guanajuato. Esta localidad se ubica en la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico, subprovincia *Bajío guanajuatense* y se caracteriza por tener un clima intermedio en cuanto a humedad con porcentaje de lluvia invernal menor a 5 y con prácticas de agricultura de temporal. Se encuentra muy cerca de un banco de material calizo (INEGI, 2010).

Las muestras se obtuvieron cavando hasta aproximadamente 30 cm debajo de plantas con apariencia vigorosa. También se extrajeron plantas completas junto con suelo retenido por sus raíces. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento.

El aislamiento consistió en la siembra de las muestras de rizósfera, por medio del *método de impronta*. Este utiliza como elemento distintivo una esponja suave en forma cilíndrica de unos 3 cm de diámetro (aunque puede cambiarse dependiendo de las necesidades). La muestra de suelo se mezcló con agua destilada estéril para formar una solución saturada, o lodo, y entonces se impregnó la esponja con esta solución. Ya impregnada, se tomó una caja de Petri con medio de cultivo y se hicieron cinco improntas en ella de forma que sean más o menos equidistantes (en otras palabras, se hacen 5 *sellos* de lodo en la caja Petri con medio). Después, SIN impregnar nuevamente la esponja, se hacen otras cinco improntas en una segunda caja Petri con medio. De esa manera, se obtienen improntas cada vez más *diluidas*.

En este trabajo se usaron cajas con medio de fosfatos insolubles según la fórmula del NBRIP. En lo subsecuente, este medio se denominará *medio NBRIP* o *de fosfatos insolubles*. Ya sembradas, las placas con medio se incubaron a 28 °C en oscuridad por 48 h o más.

Con las raíces se llevaron a cabo procedimientos encaminados al aislamiento de bacterias del rizoplasma y endófitas. Para las primeras se procedió a tomar algunas de las raíces de los muestreos, se les retiró el suelo que retenían mediante algunas sacudidas hasta que sólo quedó el más adherido a las raíces. En una campana de flujo laminar, se procedió a retirarlo usando pinzas y agujas de disección estériles. Los aglomerados adheridos se colocaron en una caja Petri de vidrio estéril, se humedecieron con agua destilada estéril y se disolvieron para formar la solución sobresaturada. Con dicha solución se procedió a sembrar, por impronta, en medio NBRIP.

Para las bacterias endófitas se tomaron las raíces ocupadas en el procedimiento anterior y se las cortó en fragmentos de aproximadamente 1 cm. Los fragmentos se lavaron con agua de grifo y luego se sumergieron en cloramina T al 2% por 1 minuto. Después se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Finalmente, los fragmentos se colocaron en una caja Petri con medio NBRIP (seis en cada caja) y se incubaron a 28 °C en oscuridad por al menos 48 h. Se seleccionaron las colonias que crecieron formando halos en el medio. Dichas colonias fueron resemebradas tomando la colonia con un mondadiente estéril y sembrándola en una placa nueva. Esta técnica, denominada *de punción*, consiste en picar la colonia ligeramente para que algunas bacterias se adhieran al mondadientes, luego se pica sobre la superficie de una caja Petri con medio nuevo. Este procedimiento se repitió hasta que se obtuvieron cultivos axénicos (aquellos en los que se presume hay una sola especie de organismo) que formaran halo en el medio NBRIP.

IV.3. Caracterización de las cepas

Las cepas fueron pre-seleccionadas con base en el índice H/C. Aquellas con un mayor puntaje para el índice fueron caracterizadas posteriormente y el resto se descartaron, con una excepción: se incluyó una cepa que no formaban halo pero que crecía de forma similar al resto, en el medio NBRIP. Las cepas restantes se seleccionaron, usando como criterio los caracteres morfológicos descritos adelante, para trabajar con cepas diferentes.

IV.3.1. Morfología macro y microscópica

La caracterización de las cepas consistió en observar a nivel macroscópico el área del halo y la morfología colonial. El área del halo se determinó mediante análisis de imágenes a partir de fotografías de las placas tomadas a contraluz comparadas con un área de referencia. Se calculó el área del halo + colonia, considerando esta suma como el área neta del halo. Se determinó un cociente de áreas *halo / colonia* al que se denominó índice H / C. También

se hicieron observaciones usando microscopio óptico para determinar el tipo de Gram de las cepas y los tamaños de las células. Las observaciones se hicieron entre las 24 y 48 h luego de una incubación a 28 °C en oscuridad.

IV.3.2. Aprovechamiento de ACC como fuente de nitrógeno

Las cepas seleccionadas se sembraron en un medio mínimo con ACC como única fuente de nitrógeno. La siembra se hizo por punción en el medio y las placas se incubaron a 28 °C en oscuridad por 48 h. El procedimiento fue descrito por Penrose y Glick (2003) donde el medio es una modificación de la fórmula de Dworkin y Foster (1958).

IV.3.3. Solubilización *in vitro* de fosfatos

Para determinar cuantitativamente la solubilización de fósforo que producían las cepas *in vitro* se midió la concentración del elemento en el caldo NBRIP inoculado. Para tal efecto se empleó la técnica colorimétrica de azul de molibdato, un procedimiento químico en el que los iones molibdato Mo_3O_{10} se unen al fósforo sustituyendo a los átomos de oxígeno. Todo ocurre en un medio ácido que mantiene los compuestos ionizados. Al reducir el molibdato se produce resonancia espectrofotométrica, lo que da el color azul. Como la resonancia es directamente proporcional a la concentración de ortofosfatos en el medio de reacción, es posible conocer dicha concentración en función de la intensidad del color.

El ensayo se montó inoculando, por triplicado, cada una de las cepas seleccionadas y un control negativo en tubos de ensayo de 100 mL con caldo NBRIP. Se incubaron a 28 °C y con agitación. Posteriormente, con una micropipeta de 1 mL se extrajo 1 mL del caldo, se colocó dentro de un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se precipitó la fracción celular sometiéndolo a 1000 x g por 20 min. Se colectó el sobrenadante y se pasó a un tubo Eppendorf nuevo y estéril. Una alícuota de la solución en el tubo fue ensayada mediante el método de azul molibdofosfórico.

Se llevaron a cabo dos ensayos, el primero fue exploratorio por lo que se trabajaron menos cepas que en el segundo. El período de incubación del primer ensayo fue de 120 h (5 días), mientras que el del segundo fue de 48 h. En el segundo ensayo se excluyeron algunas cepas no evaluadas en el primero.

IV.3.3.1. Determinación de fósforo por el método de azul molibdofosfórico

El método denominado II por Jackson (1982) o *método de azul molibdofosfórico en medio de ácido clorhídrico*, presenta la segunda sensibilidad más alta de los descritos por el autor, siendo el denominado método I el más sensible. Es importante decir que este método resulta

fácilmente afectado por contaminación con fósforo. Por esa razón, durante el desarrollo de la técnica se tomaron precauciones para evitar respirar o toser sobre los reactivos y recipientes usados. De preferencia se usaban tapabocas, bata cerrada y guantes de nylon. El material se lavaba con Extran (detergente libre de fosfatos) y se enjuagaba en agua destilada. En todos los reactivos preparados se usaba agua desionizada.

Para montar la reacción se agregó, con una pipeta de vidrio, una alícuota de la solución a ensayar a un recipiente, en este trabajo se usaron tubos Falcon de 50 mL. Se agregaron 3 gotas del indicador 2,4-dinitrofenol, que se vuelve amarillo cuando la solución se aproxima a pH de 3 desde la región ácida, para determinar si la muestra está a un pH cercano a 3, que es lo adecuado. Se busca que la solución tenga una tonalidad amarillo pálido a incoloro. En caso que no sea así, se agregan gotas de NH_4OH 4 N o HCl 4 N, según sea el caso, hasta alcanzar la coloración mencionada. Ya ajustado el pH de la alícuota, se agregaron 5 mL de ácido cloromolíbico y después se diluyó hasta 25 mL con agua destilada. La solución se mezcló agitándola suave pero ágilmente.

En este punto es importante mantener una temperatura de 25 ± 5 °C para hacer la determinación. Sólo entonces se agregaron 0.15 mL, aproximadamente 3 gotas de pipeta Pasteur, de ácido cloroestañoso reductor y se mezcló íntimamente. La solución toma, casi de inmediato, una coloración azulosa, cuyo tono depende directamente de qué tan concentrada esté la muestra. Se esperaron 5 min para que el color de la reacción se estabilizara y se leyó en un espectrofotómetro a 660 nm usando una celda de plástico desechable de 1 mL. Dado que el color es estable hasta los 20 min, todas las lecturas fueron hechas dentro de un periodo de 15 min. En la Figura IV.1 se muestra un esquema simplificado del procedimiento.

Antes de evaluar las muestras de interés, se elaboró una curva patrón o de calibración que permitió establecer una relación matemática entre la absorbancia a 660 nm y la concentración de fosfatos (en ppm) en la reacción. Para montarla se preparó, primero, una solución de 10 ppm a partir de la de 50 ppm haciendo una dilución 1:4 en agua deionizada: una parte de la solución 50 ppm en cuatro de agua. Esta se diluyó para obtener 8 soluciones con concentraciones menores de fósforo. En la Tabla IV.1 se muestra cuánto hay que agregar de la solución de 10 ppm para obtener 8 soluciones menos concentradas considerando que el volumen final de la reacción es de 25 mL. A continuación se llevó a cabo la reacción descrita antes, para las concentraciones recomendadas en la tabla que no son otra cosa que los puntos recomendados para la curva patrón (Jackson, 1982). Cada punto en la curva se elaboró por triplicado. Con los datos de absorbancia obtenidos se hizo un análisis de regresión lineal para obtener una función tal que para un valor dado de absorbancia, se obtuviera un valor, en ppm, de concentración de fósforo en la reacción.

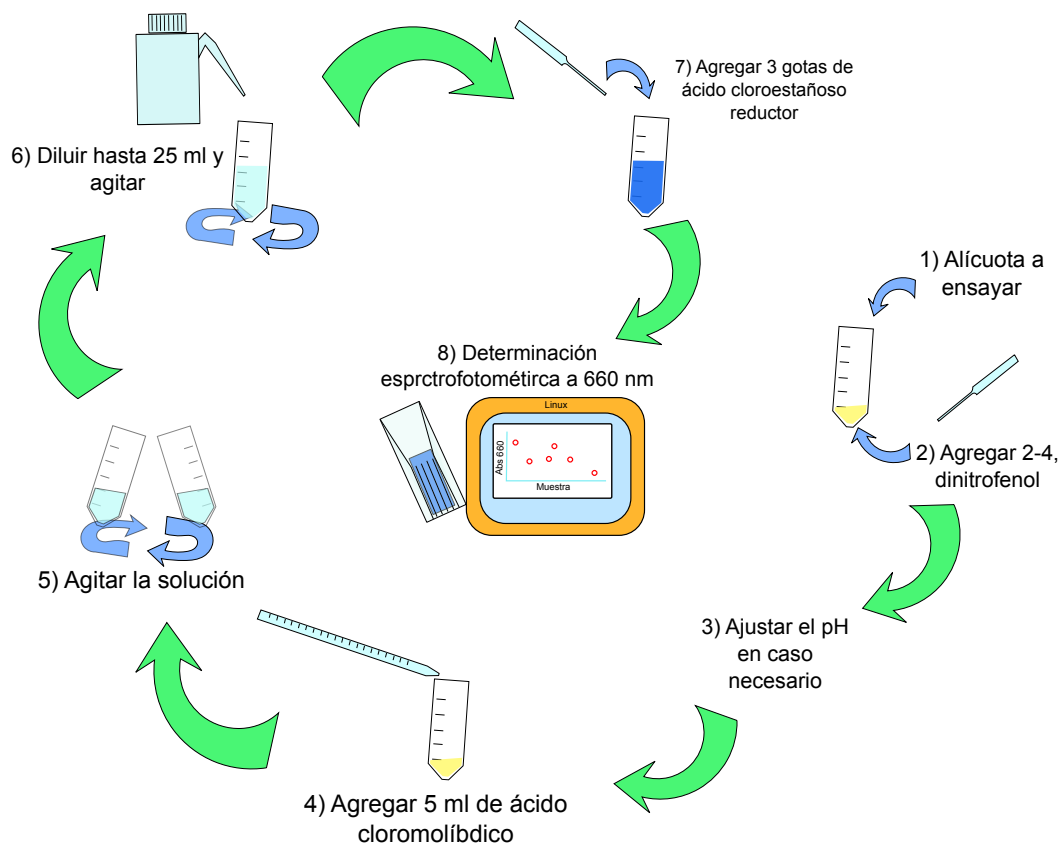


Figura IV.1. Procedimiento simplificado para montar la reacción colorimétrica y determinar la concentración de fósforo de una muestra mediante el método del azul de molibdeno.

Hecho esto se procedió a ensayar las muestras para determinar su concentración de fósforo. Para hacerlo se deben conocer los datos a continuación mencionados:

1. la concentración de fósforo en la reacción (que obtendremos conociendo la absorbancia de la reacción y sustituyendo su valor en la función de regresión).
2. el volumen de reacción (en este caso fueron 25 mL).
3. el volumen de la alícuota, que varía dependiendo de qué tan concentrada esté la solución a ensayar. Para aquellas muy concentradas habrá que usar volúmenes menores, y viceversa. Es el volumen que proviene de la solución que se va a ensayar y que no debía pasar de 5 mL.
4. el volumen total de la solución a ensayar, también podemos llamarlo el *extracto*.

De esa manera tenemos una relación del tipo:

$$\frac{A}{R} = \frac{V_R}{V_A} \quad \text{por lo tanto} \quad A = \frac{R(V_R)}{V_A} \quad (\text{IV.1})$$

Donde:

A Concentración de fósforo en la alícuota ensayada en la reacción.

R Concentración de fósforo en la reacción.

V_R Volumen de la reacción.

V_A Volumen de la alícuota ensayada en la reacción.

Con la fórmula IV.1, podemos obtener la concentración en la alícuota, que es la misma que la concentración del extracto de donde se obtuvo; en este caso, de un medio de cultivo inoculado con bacterias solubilizadoras de fósforo.

IV.3.4. Ensayo en invernadero

Se montaron dos experimentos en invernadero utilizando sorgo y lechuga para evaluar directamente los efectos de las cepas en un sistema más parecido al agrícola. Se incluyó un consorcio de HMA, para determinar si existía un efecto conjunto entre el consorcio de hongos y alguna de las cepas que se viera reflejado en las variables que se consideraron. En el ensayo

Tabla IV.1. Volúmenes de los reactivos usados en la preparación de las soluciones para la curva patrón de fósforo. El volumen final de cada reacción es 25 mL, el cual se alcanza aforando con agua destilada.

Concentración final (mg/L)	Solución 10 ppm P (mL)	ácido cloromolibdico (mL)	ácido cloroestañoso ^a (mL)
0.00	0.00	5	0.15
0.04	0.10	5	0.15
0.10	0.25	5	0.15
0.20	0.50	5	0.15
0.40	1.00	5	0.15
0.60	1.50	5	0.15
0.80	2.00	5	0.15
1.00	2.50	5	0.15

con sorgo se aplicó la fertilización de fósforo con dos compuestos diferentes con lo que se pretendió determinar si, junto con las cepas y el consorcio, el tipo de compuesto de fósforo producía efectos sobre las variables consideradas.

Aplicación del inóculo de hongos micorrícicos

Para la aplicación del consorcio de HMA procedentes de selva, primeramente se determinó el número de esporas en el sustrato con el consorcio. Debido a que los hongos micorrícicos presentan varios tipos de propágulos, que van desde fragmentos de raíz infectados hasta esporas, el número de esporas puede ser un subestimado del potencial de infección del sustrato con el consorcio. Se determinó que el sustrato contaba con 65 esporas por cada 50 gramos de suelo, 1.3 esporas por gramo, por lo que la aplicación de este tratamiento consistió en agregar 50 gramos del consorcio al suelo de la maceta a 5 cm bajo la superficie y justo debajo de la zona donde se sembraron las semillas.

Método de extracción de esporas de hongos micorrícicos

1. Primeramente, se procedió a pesar 50 g del suelo del consorcio en un recipiente cualquiera. Se le adicionó agua y se agitó la mezcla. El sentido de este paso es disgregar conglomerados en el sustrato y liberar las esporas a la solución.
2. Posteriormente, la mezcla se vació, poco a poco, sobre una serie de 3 tamices colocados en serie con el de mayor apertura arriba y el de menor hasta abajo. Utilizando una

varilla de vidrio o una cuchara plástica se va lavando el suelo en cada tamiz. Esto se hizo hasta que el agua saliera transparente. Se debe tener cuidado en no derramar agua que aún esté dentro del tamiz pues las esporas en ella se perderán y el conteo puede no ser tan certero. Las medidas de los tamices usados fueron las siguientes:

- a) Tamiz con aperturas de 0.420 mm. Este se usó para eliminar partículas grandes en la mezcla.
 - b) Tamiz con aperturas de 0.149 mm. Este elimina la mayor parte de las partículas en el suelo.
 - c) Tamiz con aperturas de 0.038 mm. Este retiene la mayor parte de las esporas, cuyo tamaño promedio oscila entre los 50 y 600 μm (0.05 y 0.6 mm).
3. El suelo colectado en el tamiz con la menor apertura se vertió, usando la cuchara o una piceta con agua destilada, en dos tubos Falcon para centrífuga de 50 mL de manera que en cada tubo se tuviera, más o menos, la misma cantidad de suelo. Esto es importante pues en el siguiente paso fue necesario equilibrar los pesos de ambos tubos.
 4. Los tubos se introducen en una centrífuga y se someten a un velocidad angular de 2000 revoluciones por minuto, rpm, por un tiempo de 2 min. Es importante que el peso de los tubos sea muy cercano para no causar un accidente por desbalance. El sobrenadante se desechó.
 5. Es importante observar de forma aproximada el volumen que ocupa el suelo en el tubo. Entonces se agregó aproximadamente ese mismo volumen de la solución de sacarosa-Tween 20. Se mezcló usando una varilla o una cuchara para revolver muy bien. En este paso, las esporas del hongo se disuelven en la solución de sacarosa-Tween 20 y debido a la densidad de dicha solución, las esporas permanecerán en ella incluso después de someterla a una fuerza centrífuga.
 6. Después se tomaron los tubos y se sometieron de nueva cuenta a una velocidad angular de 3000 rpm, en una centrífuga, por 2 min. Luego, el sobrenadante fue vertido sobre el tamiz más pequeño (0.038 mm) y se lavó, con agua destilada, para retirar la solución de sacarosa-Tween 20.
 7. La mezcla de suelo y esporas resultante se colectó en un tubo Falcon de 50 mL.
 8. Posteriormente se hizo el conteo de esporas primero agitando muy bien el contenido del tubo Falcon para homogeneizarlo y se vertió en una caja Petri de vidrio. Con ayuda de una pinza de disección, un contador y un estereoscopio se procedió a contar las esporas de ambos tubos.

9. Se hizo un conteo de esporas de ambos tubos usando un estereoscopio y cajas Petri de cristal. Con el número de esporas encontrados en 50 g de sustrato se aplica una "regla de tres simple" para saber el número de esporas en 1 g del mismo y esa cantidad fue la que se reportó.

Fertilización con fósforo

En el ensayo de sorgo, el fósforo se aplicó usando diferentes sales de fósforo: el fosfato tricálcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, que es insoluble en agua por lo que está poco disponible para la planta y el fosfato monobásico de potasio, KH_2PO_4 , que presenta una solubilidad alta, de 33 g en 100 mL de agua a 25 °C y es usado típicamente como fertilizante. Los compuestos se aplicaron mezclándolos con el sustrato de cada maceta de forma que en cada una hubiera una concentración de 11 kg de fósforo por Ha, lo que equivalió, considerando el área de la maceta, a 0.1177 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ o 0.1033 g de KH_2PO_4 . La fertilización se hizo con esta concentración porque se pretendió trabajar con un sustrato que tuviera cantidades de fósforo suficiente como para no provocar un estrés nutricional fuerte en la planta. No se usó una concentración mayor porque no se pretendía emular un suelo bien fertilizado. Los resultados del trabajo de Barraco *et al.* (2007) se tomaron como referencia decidir la cantidad de fósforo aplicado.

En el ensayo con lechuga, la fertilización se hizo mediante un mezclado mecánico, usando fosfato tricálcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, en una concentración de 55 kg por ha, emulando un suelo con reservas de fósforo poco disponibles para las plantas. Para hacerlo, también se consideró el área del suelo expuesto en la maceta.

Aplicación de las cepas

El tratamiento de cuatro cepas solubilizadoras y el control negativo se aplicó de la siguiente forma; primeramente se crecieron las cepas en caldo nutritivo incubándolas 24 h a 28 °C en oscuridad. Luego, en campana de flujo laminar, se vació el medio inoculado a tubos Falcon para centrífuga y se sometieron a 1000 x g para separar la fracción celular, se decantó el sobrenadante, consistente en el caldo nutritivo y se las resuspendió en agua destilada estéril. Se determinó la absorbancia de los cuatro cultivos resuspendidos y, posteriormente, se diluyeron hasta que tuvieron una absorbancia similar a la más baja registrada; de esta manera la densidad óptica fue igual para todas, en este caso 0.2715 a 640 nm. En estas condiciones se aplicó 1 mL de inóculo bacteriano a cada maceta sobre la zona donde se sembraron las semillas de sorgo.

Tabla IV.2. Variables consideradas en los ensayos de invernadero.

VARIABLES AGRONÓMICAS	VARIABLES FISIOLÓGICAS
Biomasa ^a	
Vástago ^b	Conductancia estomática
Raíz	Concentración interna de CO ₂
Total	Tasa de transpiración
Índice R/V ^c	Tasa fotosintética
Número de hojas	
Volumen de raíz ^d	

^aLa masa de la planta seca.

^bComprendido como la parte aérea de la planta.

^cEl cociente de la masa de la raíz entre la del vástago.

^dMedida sólo en el ensayo con lechuga.

Preparación de las semillas

Las semillas de sorgo fueron lavadas con detergente Extran y luego sometidas a un tratamiento de etanol 70 % por 15 min para retirar el fungicida que las recubría. Se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril y se dejaron secar en servilletas limpias. Se determinó que las semillas tuvieron un porcentaje de germinación del 80 %.

Variables consideradas y su determinación

Los tratamientos se evaluaron en función de los efectos que produjeron en las plantas respecto a variables que clasificamos en dos grupos: agronómicas y fisiológicas.

Las variables agronómicas estuvieron relacionadas con la acumulación de biomasa y con el número de hojas. Las fisiológicas estuvieron relacionadas con el estado hídrico de la planta (tasa de transpiración y conductancia estomática) y con el proceso fotosintético (tasa fotosintética y la concentración interna de CO₂). La tasa fotosintética se refiere a la cantidad de CO₂ fijado, por unidad de área foliar, en un tiempo dado $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La concentración de CO₂ interna es una aproximación teórica de la que se encuentra en la hoja durante la medición y está expresada en ppm de CO₂. La tasa de transpiración indica que tan rápido la planta libera agua a la atmósfera y se expresó en $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La conductancia estomática da cuenta de la cantidad de agua que la planta libera a la atmósfera y se expresa en las mismas unidades que la tasa de transpiración. Es un indicador de la apertura o cierre de los estomas.

Las variables agronómicas se determinaron al finalizar el experimento. Se extrajeron las plantas de sus macetas, se lavaron con agua de grifo para eliminar el suelo adherido a la raíz

y se cortaron separando ésta de la parte aérea. Después se pesaron en una balanza analítica y, posteriormente, se metieron en bolsas de papel estraza para secarlas en un horno a 70 °C por 3 días. Ya seco, el material vegetal fue nuevamente pesado en la misma balanza analítica. El volumen de raíz se midió luego de lavar las plantas usando una probeta graduada de 10 mL.

Las variables fisiológicas se determinaron 3 días antes de finalizar el experimento. Las mediciones se hicieron en un invernadero a una temperatura de entre 26 °C a 30 °C, entre las 11:00 y las 16:00 horas, usando una lámpara incandescente. Entre esta lámpara y la planta se colocó un contenedor de acrílico transparente al que se agregó agua hasta una altura aproximada de 3 cm para que absorbiera el calor. Sobre las hojas incidía una radiación fotosintéticamente activa (PAR, *photosynthetic active region*) de $\approx 960 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se midieron 2 hojas por planta, aquellas intermedias en desarrollo (generalmente la tercera y la cuarta, contando desde la denominada banderilla), esperando un tiempo de adecuación a la cámara del aparato de 1 min aproximadamente. Las mediciones se hicieron en función del número de réplica: el primer día se midieron todas las réplicas no. 1 de todos los tratamientos, el segundo día, todas las réplicas no. 2, y el tercer día, las no. 3.

IV.3.4.1. Ensayo con sorgo

Se montó un experimento en invernadero, usando sorgo. El ensayo se prolongó hasta la floración de las plantas. Se empleó un suelo limo-arenoso con microbiota nativa de suelo agrícola como sustrato. Éste presentó un pH de 6.4, determinado como describió García Trejo (1984): a partir de 50 g de sustrato a los que se agregaron 125 mL de agua destilada estéril, relación 1:2.5 p/v, se agitó por 5 min y se midió mediante un electrodo de pH introducido en la solución. La concentración de fósforo soluble, determinada con el método antes descrito, indicó una concentración de 4 ppm.

El diseño experimental consistió en arreglo factorial completamente al azar (Tabla IV.3). Los factores se describen en seguida:

Consortio de hongo micorrízico o HMA, es el factor que correspondió al consorcio de selva usado en este trabajo. Los dos niveles que se consideraron fueron "Inoculado" cuando se aplicó el consorcio, y "sin inocular" cuando no se aplicó.

Fuente de fósforo o P, este factor corresponde al tipo de compuesto usado como fuente de fósforo. Los dos niveles fueron "Soluble" (Ps) cuando se aplicó KH_2PO_4 , e "Insoluble" (Pin) cuando se aplicó $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Cepa solubilizadora o bacteria solubilizadora de fosfatos, BSF, es el factor que correspondió a la inoculación de las cepas. Los cinco niveles correspondieron a las cepas "FosfoIII", "ICA1001", "C1-4", "MET01" y el control sin bacteria.

Tabla IV.3. Arreglo factorial del ensayo de sorgo.

	HMA ^a		sin HMA	
	P _s ^b	P _{in} ^c	P _s	P _{in}
Cntrl				
F3				
ICA				
C14				
MET				

^a Consorcio de hongos micorrícicos.

^b Fósforo soluble.

^c Fósforo insoluble.

La forma en la que se montó el ensayo fue la siguiente: primero se aplicaron los tratamientos de fosfato en el sustrato de cada maceta, luego se inoculó el tratamiento con el sustrato del consorcio en las macetas correspondientes, después se sembraron las 4 semillas de sorgo en el centro de cada maceta a 1.5 cm de la superficie y, finalmente, se inocularon las cepas bacterianas en las macetas correspondientes. Las cepas se inocularon muy cerca de las semillas para que tuvieran mayor probabilidad de infectar la raíz cuando comenzara la germinación. Los propágulos del consorcio, por su parte, pueden sobrevivir períodos de tiempo más prolongados hasta que perciben la presencia de un hospedero susceptible para infectarlo, por eso se inoculó bajo la zona de siembra.

IV.3.4.2. Ensayo con lechuga

Se montó un experimento en invernadero usando plántulas de lechuga como modelo para evaluar el efecto de 12 de las cepas seleccionadas. El sustrato consistió en suelo limo-arenoso que fue esterilizado en autoclave a $\approx 1.2 \text{ kg/cm}^2$ por 1 h, 3 días seguidos. El diseño experimental consistió en un arreglo factorial completamente al azar (Tabla IV.4). Los tratamientos se describen a continuación:

Conorcio de hongo micorrícico es el factor que correspondió al consorcio de selva. Los dos niveles que se consideraron fueron la aplicación del consorcio, y cuando no se aplicó.

Cepa solubilizadora es el factor que correspondió a la inoculación de las cepas solubilizadoras. Los 13 niveles correspondieron a 12 de las cepas solubilizadoras seleccionadas y el control.

Tabla IV.4. Arreglo factorial del ensayo en lechuga.

	HMA ^a	sin HMA
Cntrl		
F3		
ICA		
C14		
MET		

^a Consorcio de hongos micorrícicos arbusculares.

La forma en la que se montó el ensayo fue el siguiente: primero se aplicó y mezcló el fosfato insoluble en el sustrato y después se llenaron las macetas con él. Se aplicó el inóculo del consorcio en las macetas correspondientes y después se trasplantaron las plántulas de lechuga, una por maceta. Finalmente se inocularon las cepas bacterianas en las macetas, según correspondiera.

IV.4. Análisis de datos

La variable que cumpliera con las asunciones del análisis de varianza, ANOVA, se analizó con dicho procedimiento para determinar si los tratamientos y sus interacciones tuvieron efectos significativos. Cuando tales asunciones no se cumplían, la variable se transformó mediante rangos alineados y se analizó de la misma forma.

Se empleó este tipo de transformación para el análisis porque, entre otras ventajas, esta transformación permite el análisis de las interacciones entre los tratamientos, característica en la que la transformación de rangos convencional no posee dada la naturaleza no lineal de los rangos. La transformación de rangos convencional consiste en ordenar n datos de menor a mayor, luego se les asigna números desde 1 hasta n . En caso de que dos valores sean iguales, sus rangos se promedian y este promedio es el rango que se asigna a ambos (Quinn y Keough, 2003).

Al comparar más de dos medias, se utilizó la Diferencia Mínima Significativa de Fisher (DMS) para ensayos de invernadero y la Diferencia Honestamente Significativa de Tukey (DHS) para ensayos en laboratorio. Se estableció una significancia del 95 % ($\alpha = 0.05$) como nivel de confianza para este estudio.

V. Resultados y discusión

V.1. Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfato

Se aislaron varias cepas del suelo de la localidad de "Valencianita", pero únicamente se seleccionaron cuatro. Tres de ellas presentaron halos más conspicuos que el resto y la cuarta no formaba halo alguno. Las cepas fueron: *ICA1001*, *RECM1003-GP*, *C1-4* y *MET01*. Esta última no produjo halo pero pudo crecer en el medio NBRIB. En cuanto a su procedencia, la cepa *ICA1001* fue aislada del interior de las raíces de agave (bacteria endófito). Las cepas *MET01* y *C1-4* fueron aisladas como bacterias asociadas a *ICA1001* luego de resiembras sucesivas. La cepa *RECM1003-GP* fue aislada de la rizósfera de plantas de maíz.

Los estudiantes Adolfo Villegas Méndez y Víctor Hugo Laguna Corona amablemente donaron 14 aislados y una cepa de *Bacillus megaterium*, respectivamente. Por su parte, el Dr. Francisco Alejo amablemente donó la cepa SBP08 aislada de suelo de bosque de encino. En total, se contó con 21 cepas solubilizadoras de fósforo.

Para el aislamiento, el método de impronta resultó apropiado debido a que permitió el aislamiento de organismos que no dominan en el sitio de donde se obtiene la muestra. La selección de las cepas de "Valencianita" se basó en la magnitud del halo y la colonia, en medio NBRIP. El $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ le da un color blanco al medio (es azul si se agrega azul de bromotimol como indicador). La degradación (por acidificación, por ejemplo) de este compuesto en el medio produjo su decoloración localizada, lo que dio lugar al halo.

El hecho de que las cepas pudieron crecer en el medio da cuenta de su habilidad para aprovechar una fuente de fósforo en forma insoluble o para tolerar la deficiencia de fósforo. Sin embargo, existe evidencia de la existencia de microorganismos capaces de sustituir el fósforo por As en sus estructuras biológicas (Wolfe-Simon *et al.*, 2011). Sin embargo, en este trabajo no se evaluó este rasgo y se asumió que a lo mucho, las cepas aisladas sólo eran capaces de tolerar la deficiencia de fósforo por procesos de optimización y reciclaje, como sí ocurre en plantas superiores (Hammond *et al.*, 2004).

El halo fue elemental para la caracterización preliminar, por lo que las cepas fueron seleccionadas con base en su capacidad para degradar la fuente de fósforo en el medio. La

formación de halo se debió a la acidificación del medio, lo anterior evidenciado por los halos teñidos de levemente de amarillo, indicando un pH inferior a 6, en el medio NBRIP con indicador azul de bromotimol.

De acuerdo con Arcand y Schneider (2006) existen formas para solubilizar fósforo sin necesidad de alterar el pH lo que justifica la selección de la cepa MET01, que crecía en el medio NBRIP sin formar halo.

V.2. Caracterización

V.2.1. Morfología macro y microscópica

Se observaron morfologías coloniales diversas. Varias cepas produjeron gran cantidad de mucílago cuando se crecieron en medio NBRIP, mientras que en medio PDA la producción se redujo. A nivel microscópico, los bacilos fueron la morfología más común, pero también se presentaron diplobacilos, cocobacilos y estreptobacilos. En cuanto al tipo de pared, se observó un mayor número de cepas Gram negativas y sólo dos Gram positivas, entre las que se encuentra la cepa RECM1003-GP. Se observaron células desde 4 hasta 1 μm de longitud. Por cuestiones prácticas, aquellas cepas con las mismas características macro y microscópicas se consideraron afines o similares. En las Tablas V.1 y V.2 se muestran las características morfológicas de las cepas estudiadas.

V.2.2. Aprovechamiento de ACC como fuente de Nitrógeno

Tres de las cepas no crecieron en el medio ACC: RECM1003-GP, 1.4N-P1 y MET01. El resto presentaron crecimientos suficientes como para considerarlos promotoras de crecimiento por mecanismos relacionados con la reducción de los niveles de etileno en la planta. Sin embargo, estos datos no son concluyentes pues en la literatura se menciona que es difícil tener un medio de cultivo de este tipo que carezca totalmente de fuentes de nitrógeno (Penrose y Glick, 2003). Según Kausar y Shahzad (2006) y Glick y Penrose (2004), las cepas serían capaces de favorecer el crecimiento de raíz en condiciones que normalmente lo detendrían debido al exceso de etileno, tales como sequías, inundaciones, suelos con metales pesados e infecciones por organismos fitopatógenos.

Tabla V.1. Morfología de las colonias de las cepas seleccionadas.

Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Pigmento	Propiedad óptica	Índice H/C ^a
1.4N-P1	Irregular	Entero	Convexo	Concéntrica	Ámbar	Traslúcida	04.03765
1.4N-P2	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Ámbar	Traslúcida	03.26015
1.9N	Irregular	Entero	Convexo	Lisa	Ámbar	Traslúcida	04.20663
2.10N	Irregular	Entero	Convexo	Lisa	Ámbar	Transparente	02.26164
2.1N	Circular	Entero	Elevado	Lisa	Ámbar	Traslúcida	03.21733
2.8N-GC1	Circular	Entero	Convexo	Concéntrica	Ámbar	Traslúcida	04.21812
2.8N-GC2	Circular	Entero	Elevado	Concéntrica	Ámbar	Traslúcida	06.90182
3.2N	Irregular	Entero	Convexo	Concéntrica	Café claro	Traslúcida	03.75213
3.9N	Circular	Lobado	Elevado	Lisa	Café claro	Traslúcida	04.13557
5.10N-1	Irregular	Entero	Convexo	Concéntrica	Café-ámbar	Traslúcida	12.30511
5.10N-2	Irregular	Entero	Convexo	Concéntrica	Café claro	Traslúcida	03.69715
5.3N	Irregular	Entero	Convexo	Concéntrica	Ámbar	Traslúcida	04.05792
B.mega	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Crema	Opaca	01.95891
C1-4	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Crema	Opaca	02.12357
Fosfo III	Irregular	Entero	Elevado	Convexo	Café-ámbar	Traslúcida	10.50257
ICA1001	Irregular	Entero	Elevado	Radiante	Ámbar	Traslúcida	07.75009
MET01	Irregular	Lobado	Elevado	Arrugada	Café	Opaca	Na
RECM1003-GP	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Crema	Opaca	01.83674
SBP08	Circular	Entero	Convexo	Lisa	Crema	Opaca	04.35809
4.8N	Irregular	Entero	Convexo	Concéntrica	Café claro	Opaca	03.58045
Fosfo2-9	Circular	Entero	Convexo	Concéntrica	Amarillo claro	Traslúcida	03.57824

^aEl índice H/C se refiere a la división del área del halo, observado en el medio NBRIP, por el área de la colonia creciendo en dicho medio. Si es > 1, mayor es el halo producido en relación con la colonia.

Tabla V.2. Morfología microscópica de las cepas seleccionadas.

Cepa	Tinción Gram	Longitud celular(μm)	Ancho celular(μm)	Forma
1.4N-P1	Neg	3.0-2.0	0.8	Bacilo
1.4N-P2	Neg	1.2-1	0.7	Bacilo
1.9N	Neg	1.2	0.8	Bacilo
2.10N	Neg	1.2	0.8	Bacilo
2.1N	Neg	1.5-1.2	0.8	Bacilo
2.8N-GC1	Neg	3.0-2.0	0.5	Bacilo
2.8N-GC2	Neg	1.8	0.8	Bacilo
3.2N	Neg	2.0-1.8	0.8	Bacilo
3.9N	– ^a	2.0	1.0	Bacilo
5.10N-1	Neg	3-2	0.7	Bacilo
5.10N-2	Neg	1.2-1.0	0.8	Bacilo
5.3N	Neg	2.0	0.8	Bacilo
B.mega	Pos	4.0	2.0	Bacilo
C1-4	–	3.0-2.5	2.0	Bacilo
Fosfo III	Neg	1.2	0.7	Cocobacilo
ICA1011	Neg	1.5	0.6	Bacilo
MET01	–	8.0-6.0	1.8	Diplobacilo
RECM1003-GP	Pos	5.0	2.0	Diplobacilo
SBP08	–	1.2	0.5	Bacilo
4.8N	Neg	2.0	1.0	Bacilo
Fosfo 2-9	Neg	0.8	0.4	Cocobacilo

^aLa coloración no permitió definir el tipo de tinción.

V.2.3. Solubilización *in vitro* de fosfatos

Las cepas evaluadas en el primer ensayo aumentaron significativamente la concentración de fósforo disuelto en comparación con el control. Las mayores concentraciones de fósforo solubilizado las produjeron 3.2N, 3.9N y 4.8N (Figura V.1). En el segundo ensayo se observó que las cepas 3.2N, MET01 y RECM1001-GP no solubilizaron fósforo pues las concentraciones observadas no difirieron significativamente de los controles. El resto de las cepas solubilizaron fósforo en concentraciones superiores a 8 mg/L, significativamente más que los tratamientos sin inóculo bacteriano.

La cepa de *Bacillus megaterium* está reportada como una especie solubilizadora de fósforo y además PGPR (López-Bucio *et al.*, 2007; Ortiz-Castro *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2007). Como control positivo para el rasgo de solubilización, los resultados indican que varias cepas pueden desempeñarse mejor que *Bacillus megaterium* solubilizando fósforo a partir de fuentes insolubles. Los resultados sugieren que la liberación de fósforo se debió a cambios en el pH pues las placas de medio NBRIP coloradas con azul de bromotimol evidenciaron condiciones de acidez.

MET01 no fue capaz de aumentar la disponibilidad de fósforo en medio líquido. La cepa RECM1003 tampoco solubilizó fósforo en medio líquido, no obstante formó halos en el medio NBRIP. Posiblemente, con un período más largo de incubación, la cepa RECM1003 habría aumentado la disponibilidad de fósforo en el medio. En el caso de MET01 existe poca evidencia para descartar la característica de solubilizador dado que el tiempo en que se evaluó fue corto.

V.2.4. Evaluación en invernadero

V.2.4.1. Ensayo en sorgo

Para facilitar la exposición de los resultados, en los siguientes párrafos se hará mención de los factores y los tratamientos de forma sintética usando las abreviaturas mostradas en la Tabla V.3

Tabla V.3. Abreviaturas de factores e interacciones del ensayo de sorgo (*Sorghum bicolor*).

Factores, Interacciones y sus Abreviaturas	Niveles y Abreviaturas	Descripción
Hongo micorrícico arbuscular (HMA)	HMA (H) sin HMA (h)	Consortio inoculado Consortio no inoculado
Fertilización de Fósforo (Fósforo)	fósforo soluble (Ps) fósforo insoluble (Pin)	Fósforo soluble Fósforo insoluble
Bacteria Solubilizadora de Fosfatos (BSF)	Cntrl F3 ICA C14 MET	cepa Control cepa Fosfo III cepa ICA1001 cepa C1-4 cepa MET01

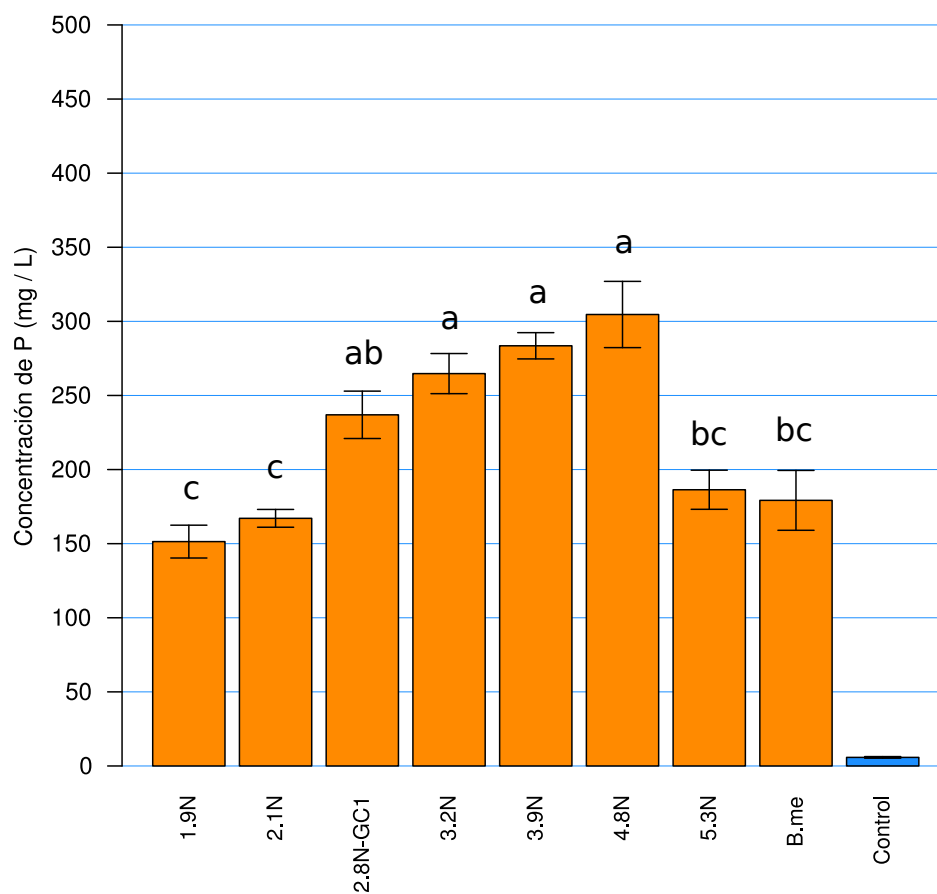


Figura V.1. Concentración de fósforo soluble liberado en el medio por las cepas luego de 5 días de incubación a 28 °C con agitación. Las medias con letras iguales no son significativamente diferentes (prueba de Tukey). Las barras representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

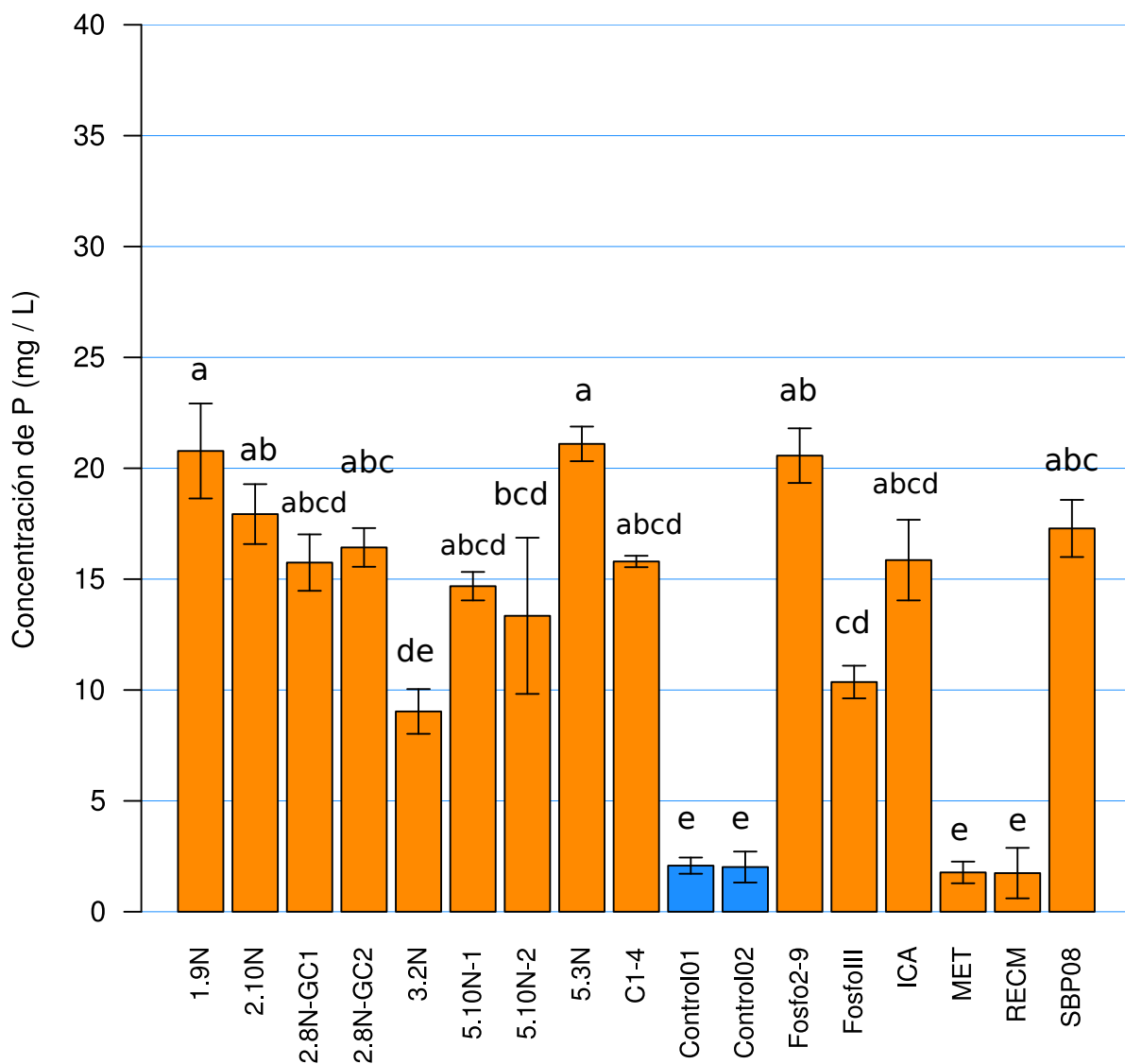


Figura V.2. Concentración de fósforo soluble liberado en el medio por las cepas luego de 48 h de incubación a 28 °C con agitación. Se incluyeron barras estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

V.2.4.1.1. Biomasa de raíz. La variable se transformó mediante la función $\log_{10}(x) + 1$ y se hizo un ANOVA. Se encontró que el tratamiento HMA y las interacciones HMA+BSF, Fósforo+BSF y HMA+Fósforo+BSF tuvieron efectos significativos sobre la variable transformada.

En general la biomasa de raíz se vio promovida significativamente por la aplicación del consorcio micorrícico, pero el efecto de las cepas sólo se observó cuando se analizaban dentro de una interacción con los otros factores. La coinoculación con el consorcio parece alterar los efectos de las cepas sobre la planta. Se observó que las cepas MET y C14 produjeron un mayor crecimiento de la raíz que los tratamientos control en presencia del consorcio ($p = 0.015$). Cabe mencionar que este efecto sólo se presentó cuando la fuente de fósforo fue KH_2PO_4 (soluble). Por otro lado, en ausencia del consorcio y con KH_2PO_4 , MET produjo una biomasa significativamente menor que las de C14 e ICA bajo las mismas condiciones. La cepa C14 tuvo un comportamiento interesante cuando se inoculaba sin consorcio y con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: mostraba deficiencias significativas en la biomasa de raíz ($p = 0.013$) comparada con los controles. Cuando se compararon las medias, para cada cepa por separado, y sus efectos con los otros factores, se observó que no había diferencias significativas en la biomasa de raíz observada. La excepción fue C14 que siguió mostrando una deficiencia significativa también a este nivel de comparación. Un resumen de lo comentado puede observarse en la Figura V.3. Aunque en ella se muestran las medias de todos los tratamientos, no es fácil observar las diferencias entre los factores.

V.2.4.1.2. Biomasa de vástago. La variable se transformó mediante la función $\log_{10}(x)+1$ y se aplicó un ANOVA. Se encontró que el tratamiento HMA y las interacciones HMA+BSF, Fósforo+BSF y HMA+Fósforo+BSF presentaron efectos significativos en la variable.

Se observó que la presencia del consorcio produjo diferencias significativas en los efectos que las cepas produjeron sobre la variable ($p = 0.016$), mientras que en su ausencia no se observaron tales efectos. Esto puede ser evidencia de que está ocurriendo una interacción entre los microorganismos inoculados. Específicamente, las cepas MET, C14 e ICA tuvieron biombras significativamente mayores a las del tratamiento sin cepa cuando se coinoculaban con el consorcio. Curiosamente, aunque en términos generales el consorcio produjo una mayor biomasa de vástago, cuando se aplicó sin cepas, no se observaron diferencias significativas entre aplicarlo o no.

El tipo de fósforo también afectó el efecto que las cepas produjeron. Se observó que sólo C14 promovió el crecimiento del vástago cuando se aplicó fósforo soluble, mientras que con fósforo insoluble, esta misma cepa provocó deficiencias significativas en la variable. Las demás cepas no difirieron del control con los diferentes tipos de fertilización. Las cepas

MET y C14 mostraron efectos sinérgicos en la variable cuando se aplicó el consorcio y la fertilización con fósforo soluble juntos. No se observó algo similar cuando se aplicó fósforo insoluble.

Considerando a cada cepa en particular, se observaron diferencias en sus efectos bajo las condiciones evaluadas. Cuando se inoculó sin el consorcio y con fósforo soluble la cepa F3 produjo una biomasa significativamente menor que con cualquier otra combinación de los factores. La cepa C14 mostró algo similar, pero más marcado, cuando se inoculó sin el consorcio y con fósforo insoluble.

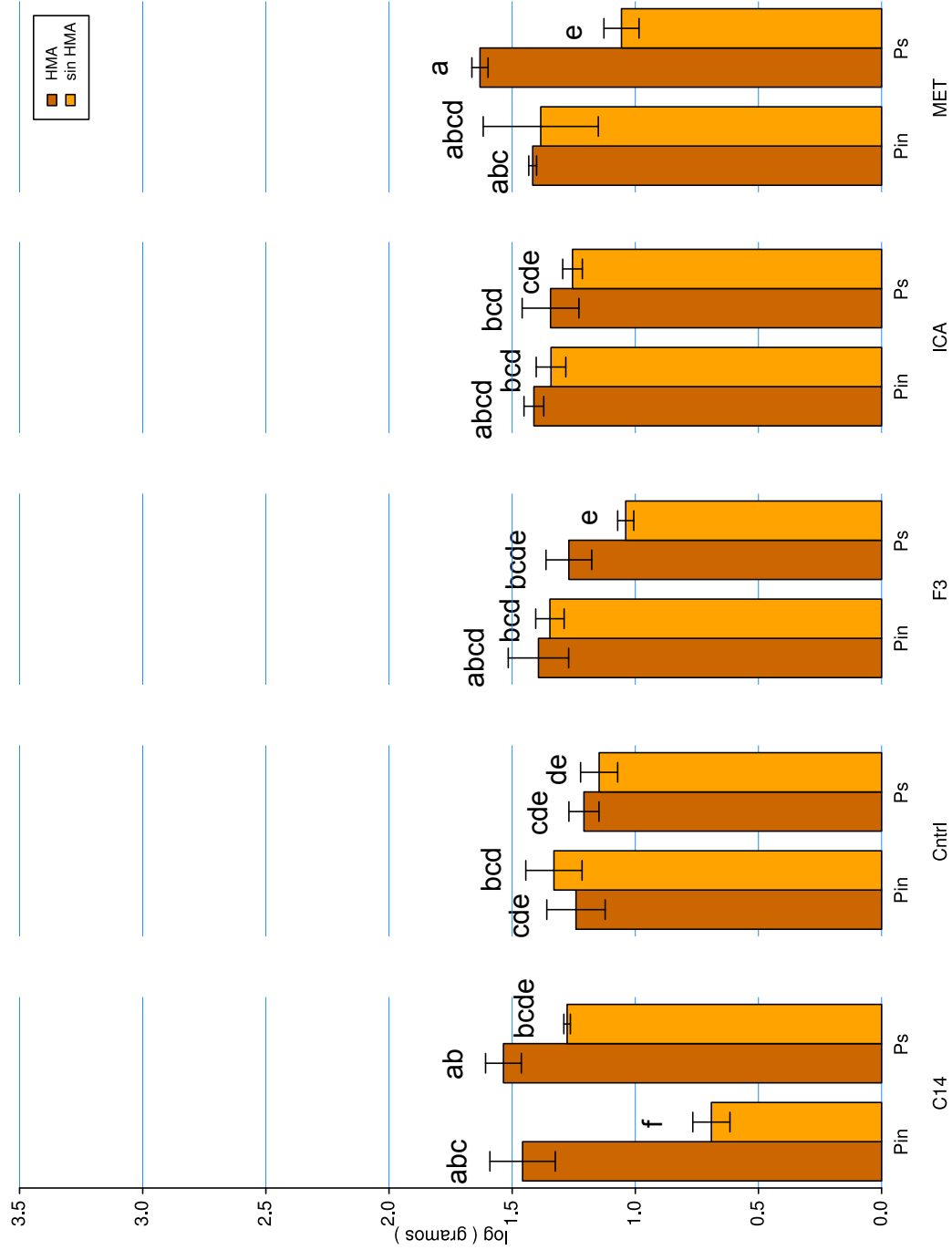


Figura V.3. Medias de Biomasa de raíz. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (prueba protegida de Fisher). Las barras representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

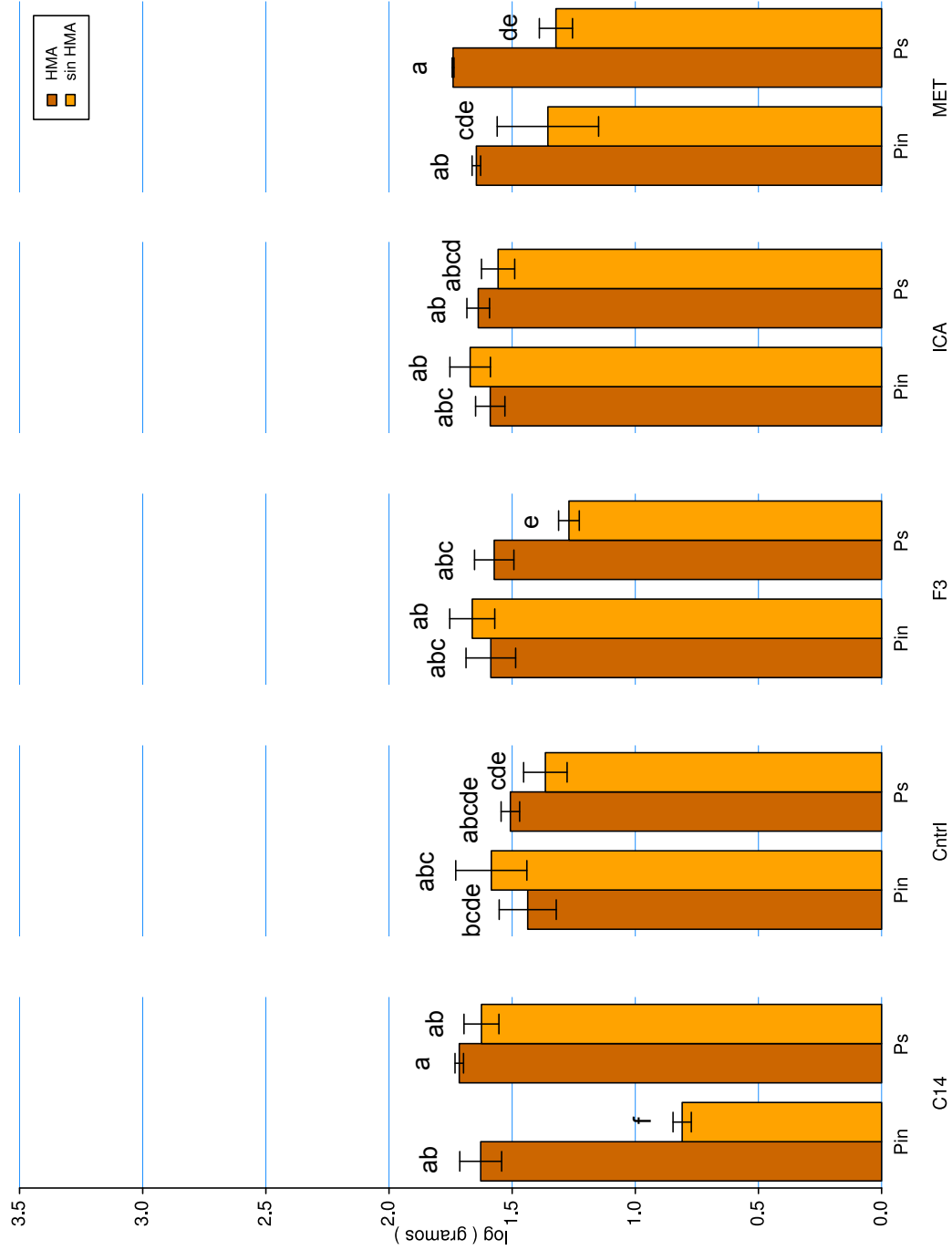


Figura V.4. Medias de Biomasa de vástago. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (prueba protegida de Fisher). Las barras representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

V.2.4.1.3. Biomasa total. La variable se transformó mediante la función \sqrt{x} y se hizo un ANOVA. Se encontró que el factor HMA y las interacciones HMA+BSF, Fósforo+BSF y HMA+Fósforo+BSF presentaron efectos significativos. En general, inocular el consorcio produjo, por sí mismo, una mayor acumulación de biomasa en las plantas de sorgo ($p < 0.001$). En cuanto a la interacción del consorcio con las cepas, se observaron dos sinergismos interesantes: inoculando el consorcio junto con C14 o MET se observaron mayores biomásas que con los tratamientos sin cepa ($p < 0.01$). Dichas cepas, por sí mismas, no pudieron igualar este efecto en la variable. La interacción entre el factor fósforo y el factor BSF sólo mostró diferencias cuando no se inoculó el consorcio. Sin embargo, los contrastes observados no permitieron deducir la combinación más adecuada de cepa y tipo de fertilización. Esto fue así porque ninguna de las combinaciones produjo biomásas mayores que los dos tratamientos sin cepa, de forma que sólo se aprecian afinidades de las cepas por uno u otro tipo de fósforo, en cuanto a sus efectos en la biomasa, claro está. En ese sentido C14 parece *preferir* al fósforo soluble, F3 al insoluble, mientras que las demás cepas parecen no mostrar alguna afinidad particular. Al inocular el consorcio no se presentan estos contrastes.

La interacción de los tres factores no mostró un sólo tratamiento que produjera significativamente más biomasa que los cuatro tratamientos sin cepa. Sin embargo, sí se observaron contrastes interesantes que sugieren que algunos tratamientos favorecen la acumulación de biomasa más que otros, por ejemplo, MET con el consorcio y fósforo soluble produjo una biomasa que superó significativamente a tres de los tratamientos sin cepa. También destaca el caso de la cepa C14: la ausencia del consorcio junto con una fertilización insoluble producen una deficiencia considerable en la biomasa de las plantas bajo ese tratamiento. Esa deficiencia es tan marcada que incluso es significativamente menor que los tratamientos sin cepa.

Considerando cada únicamente cada cepa particular, se observó que sólo C14 y MET presentaron diferencias en sus efectos al combinarse con los niveles de los factores HMA y Fósforo. Para C14 resultó claro que si no se coinocula con hongo micorrícico, fertilizar con fósforo insoluble produce deficiencias considerables en la biomasa. MET, por su parte, parece mostrar mejores efectos con fertilización con fósforo insoluble y coinoculado con consorcio.

V.2.4.1.4. Índice Raíz/Vástago. El ANOVA mostró que los factores Fósforo, BSF y la interacción HMA+Fósforo+BSF tuvieron efectos significativos sobre la variable. Se observó una tendencia que favoreció la acumulación de biomasa en la parte aérea pues no se observaron valores mayores que uno para esta variable. Comparativamente, la fertilización con fósforo insoluble se tradujo en una distribución preferencial de la biomasa hacia la raíz, a diferencia de la fertilización con fósforo soluble. En general, la cepa MET produjo un índice raíz/vástago mayor que al no icular con cepa alguna, pero no tuvo diferencias significativas

con la cepa C14. En la interacción de los tres factores se observaron pocos contrastes ya que las medias de los tratamientos estuvieron muy homogéneas. Sin embargo, el tratamiento con consorcio, fósforo insoluble y la cepa MET produjo un índice que fue el más alto de todos ($p < 0.001$). El factor BSF mostró efectos diferentes cuando se combinaba con los otros dos factores, este comportamiento estuvo muy marcado ($p < 0.001$) cuando se fertilizaba con fósforo insoluble sin aplicar el consorcio. En esas condiciones, MET produjo un índice mayor que las demás cepas y que el tratamiento sin ninguna de ellas. Considerándolas de manera individual, la mayoría de las cepas no mostró diferencias en sus efectos al combinarlas con los factores de fertilización y consorcio. Nuevamente, sólo la cepa MET mostró un efecto diferencial cuando se aplicó sin el consorcio y con la fertilización con fósforo insoluble. Esta combinación promovió un mayor crecimiento radical ($p < 0.01$).

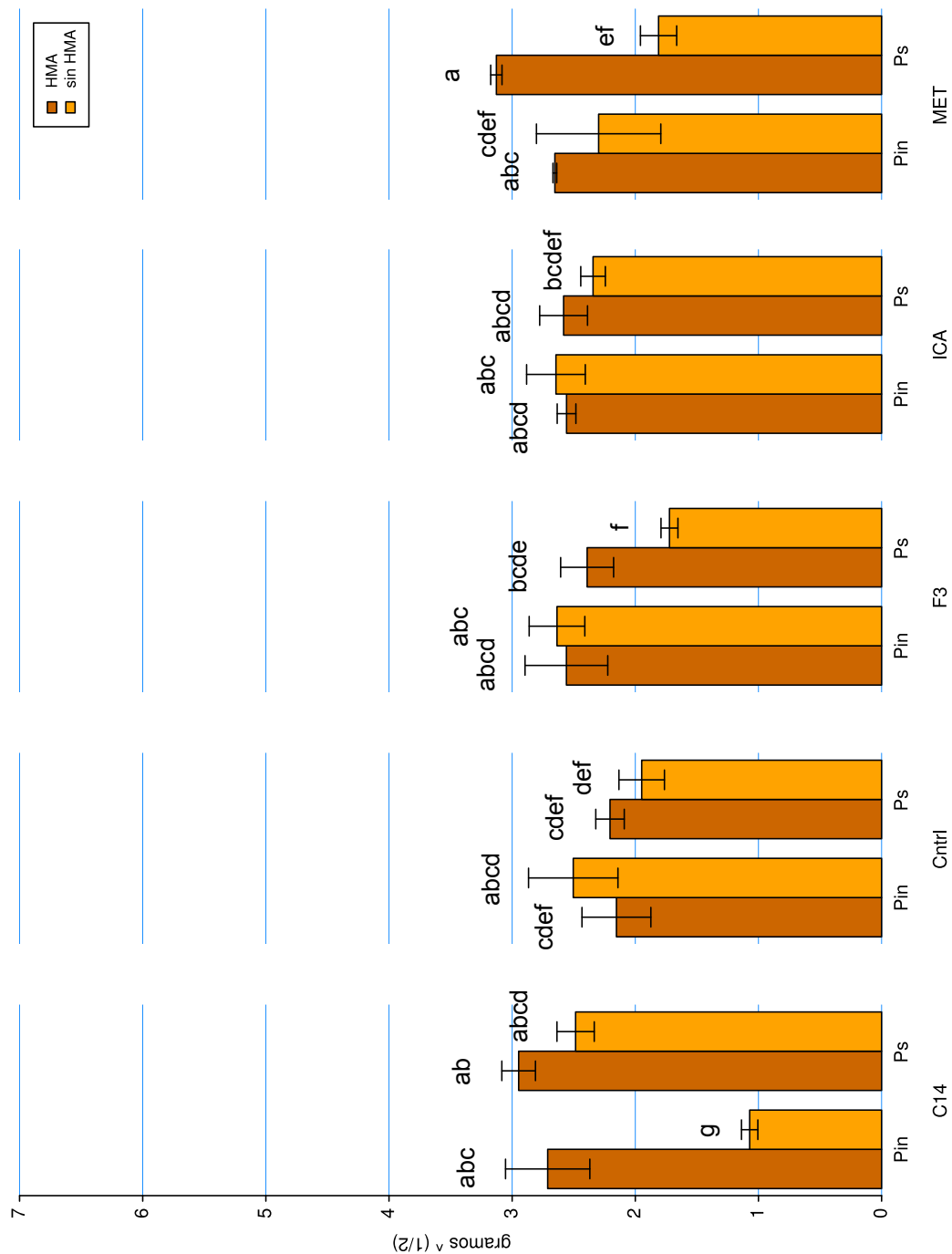


Figura V.5. Medias de Biomasa. Las medias con letras iguales no son significativamente diferentes (prueba protegida de Fisher). Las barras representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

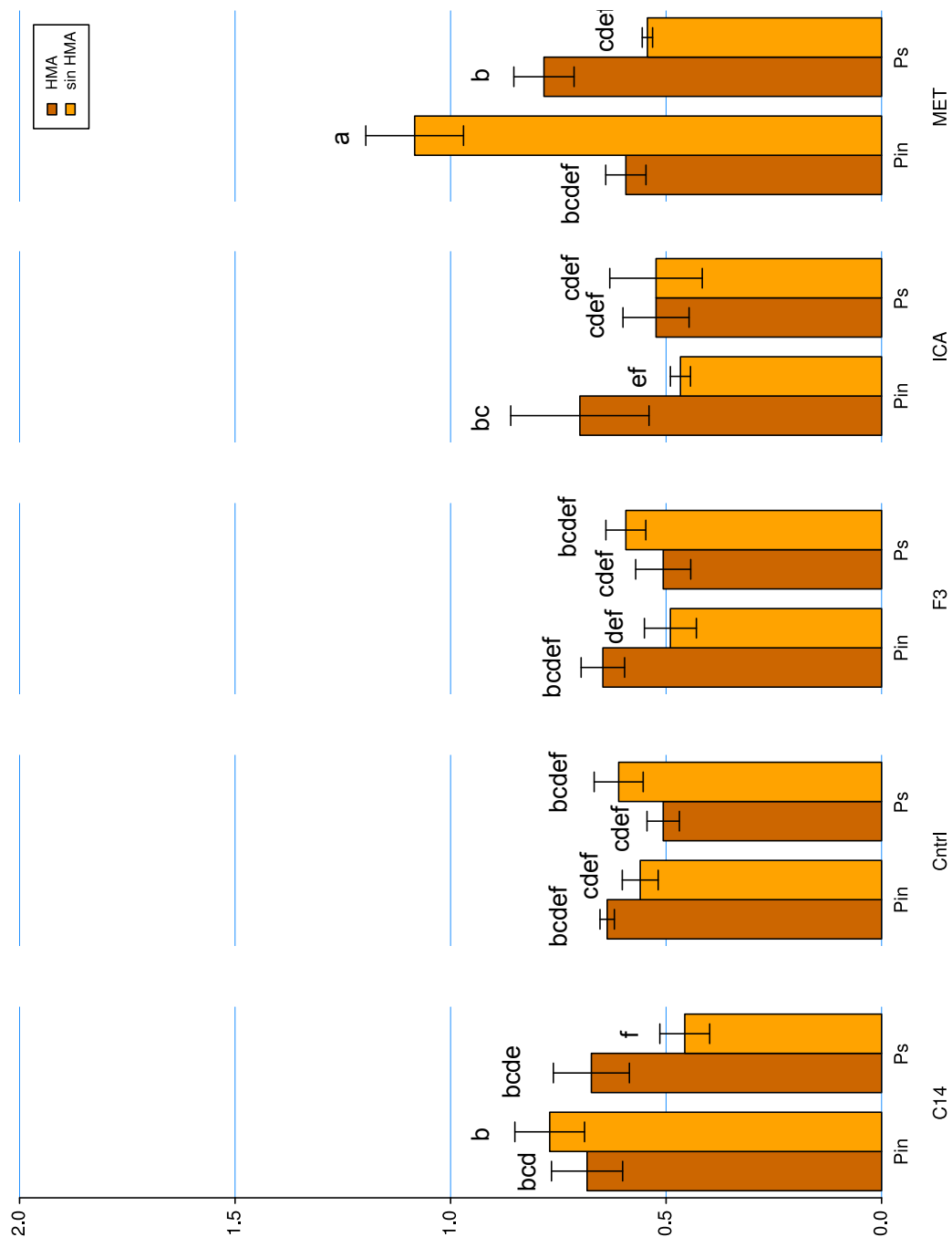


Figura V.6. Medias del índice Raíz/Vástago. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (prueba protegida de Fisher). Las barras representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

V.2.4.1.5. Número de hojas. Analizado mediante un modelo general lineal utilizando la distribución de Poisson y χ^2 , la variable no mostró diferencias en relación a ninguno de los factores.

V.2.4.1.6. Conductancia molar. La variable se transformó mediante rangos alineados y se analizó mediante ANOVA. Se encontró que el factor HMA y las interacciones HMA + Fósforo, HMA + BSF y Fósforo + BSF tuvieron efectos significativos en la variable.

Al inocular el consorcio, se produjo una conductancia molar significativamente mayor que la observada cuando no se inoculó. También se observó que las combinaciones H + Ps (consorcio y fósforo soluble) y h + Pin (sin consorcio y fósforo insoluble) produjeron una mayor conductancia molar que las otras combinaciones ($p < 0.001$). Por otro lado, aunque la interacción con el consorcio no produjo conductancias distintas a las producidas por los tratamientos sin bacteria, sí se observó que el consorcio cambiaba los efectos de las cepas cuando se inoculaban juntos. La cepa F3 produjo una conductancia mayor cuando se inoculaba sola ($p < 0.05$), lo cual se observó también con ICA, aunque no en forma significativa. MET y C14 mostraron una tendencia contraria pero al igual que con ICA, ésta no fue significativa. En su interacción con el tipo de fósforo, las cepas no mostraron diferencias significativas en sus efectos con respecto a los tratamientos sin cepa. Lo que es más, únicamente dichos tratamientos presentaron diferencias significativas entre ellos lo que refleja un efecto del tipo de fósforo sobre la conductancia: es significativamente mayor cuando la fuente es insoluble.

V.2.4.1.7. Concentración interna de CO₂. Esta variable cumplió con las asunciones de normalidad y homocedasticidad, y al analizarla mediante ANOVA se encontró efecto significativo del factor HMA sobre la variable. Los resultados sugieren que, en términos generales, la inoculación con el consorcio produce una disminución en la concentración interna de CO₂. Es de destacar que los valores obtenidos para esta variable fueron negativos para el factor HMA.

V.2.4.1.8. Tasa de transpiración. Esta variable presentó normalidad y homocedasticidad, pero el ANOVA no indicó diferencias significativas en los efectos de ninguno de los factores.

V.2.4.1.9. Tasa fotosintética. Esta variable cumplió con las asunciones del ANOVA. El análisis mostró efectos del factor Fósforo y de la interacción HMA-Fósforo.

Se observó que las plantas con fósforo insoluble presentaron una tasa fotosintética significativamente mayor que la producida con el fósforo soluble. En la interacción se observó que

el consorcio no afectó el efecto que el fósforo insoluble tuvo sobre la variable. Sin embargo, tratándose de plantas sin el consorcio, el tipo de fósforo sí tiene un efecto significativo siendo el fósforo insoluble el que presentó una media mayor a la observada con el fósforo soluble (Figura V.8).

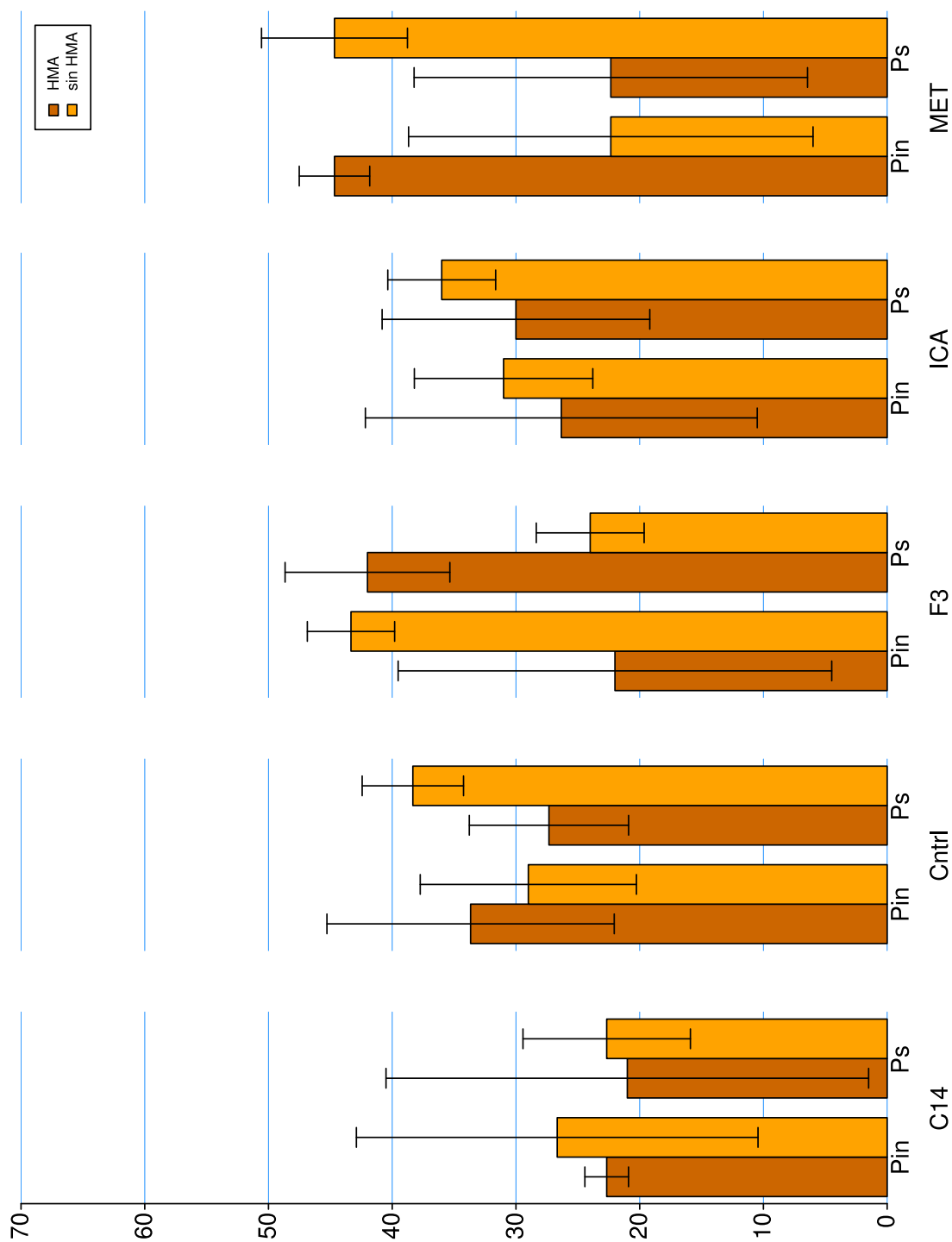


Figura V.7. Medias de rangos de la Conductancia molar. Las medias no presentaron diferencias significativas entre ellas (prueba protegida de Fisher). Las barras de error representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

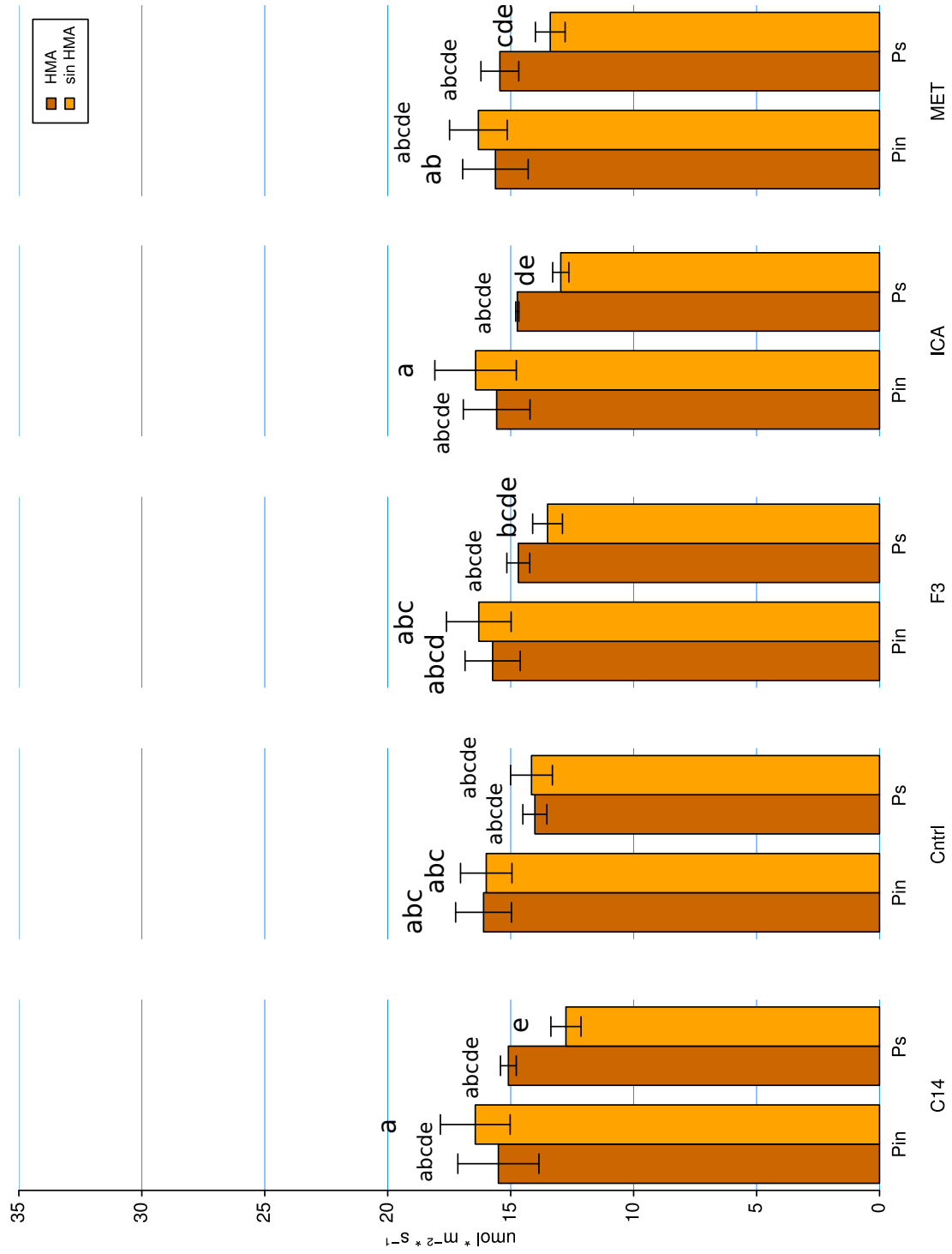


Figura V.8. Medias de la tasa fotosintética. Las medias con letras iguales no son significativamente diferentes (prueba protegida de Fisher). Las barras representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

V.2.4.1.10. Discusión. El consorcio de hongos micorrícicos tuvo efectos significativos en cuatro de las cinco variables agronómicas analizadas, siendo la aplicación del consorcio el nivel que produjo medias significativamente mayores. Sailo y Bagyaraj (2006) reportaron resultados similares con *Coleus forskohlii* (una planta medicinal) aunque, a diferencia del presente trabajo, los autores no emplearon un consorcio de hongos micorrícicos, sino una especie en particular: *Glomus bagyarajii*. Por su parte, Adesemoye *et al.* (2008) reportaron incrementos en la cosecha de maíz, respecto del control negativo, cuando se inoculó con *Glomus intraradices*, aunque no especificaron si el incremento fue significativo. Los resultados de Jansa *et al.* (2008) sugieren que, por lo general, la coinoculación de dos o más hongos micorrícicos tendrá efectos similares a los obtenidos si se inoculan solos. Sin embargo, también mencionó que se pueden dar sinergismos cuando los inóculos micorrícicos "cooperan" en sus efectos sobre el hospedero y señala que, por ejemplo, si los métodos por los que uno u otro hongo obtienen nutrientes, como el fósforo, son complementarios, puede darse un sinergismo que beneficia el crecimiento del vegetal. Esto puede explicar la similitud en los resultados aún cuando se trabajó con un consorcio.

La interacción entre el consorcio y las cepas evaluadas fue significativa en las variables de biomasa total, biomasa de vástago y de raíz, no así en el índice R/V. Las cepas MET y C14 mostraron efectos sinérgicos al inocularse con el consorcio, mientras que las cepas F3 e ICA no se comportaron diferente de los controles. De acuerdo con Adesemoye *et al.* (2008), los efectos sinérgicos se pueden presentar entre PGPRs y hongos micorrícicos específicos, pero esto no ocurre en todos los casos. Esto hace importantes a estas dos cepas dado que, al menos para sorgo, presentaron efectos sinérgicos al inocularse con el consorcio. En cuanto al factor BSF, los resultados de Cattelan *et al.* (1999) tienen contradicciones con los observados en el presente trabajo ya que algunas cepas que evaluaron en soya (*Glycine max*) tuvieron efectos significativos sobre las biomásas en vástago y raíz. Aunque no se trabajaron tantas cepas como lo hizo Cattelan *et al.* (1999), era posible, dados los resultados de los ensayos en laboratorio, que al menos una de las cepas tuviera efectos sobre las variables medidas. Una explicación a la ausencia de efectos por parte de las cepas es que la cantidad de inóculo fue distinta pues Cattelan *et al.* (1999) aplicaron los inóculos con una absorbancia de 0.55 (600 nm) cuando este trabajo lo hizo con una de 0.27 (640 nm). En ese sentido Bashan (1998) hizo hincapié en la importancia de tener una población suficientemente alta en la rizósfera para obtener una respuesta de la planta.

Ningún tratamiento tuvo medias significativamente mayores a los cuatro controles con respecto a las biomásas de raíz, de vástago y total. Sin embargo, se hizo evidente que el efecto que las cepas tuvieron dependieron, en varios casos, de las condiciones en las que se desempeñaron. Tanto el tipo de fósforo como el consorcio resultaron relevantes para los

efectos de las cepas sobre las variables agronómicas. El trabajo de Calvo-Vélez *et al.* (2008) da cuenta de la importancia de las condiciones bióticas y abióticas sobre las poblaciones microbianas, particularmente, la presencia de nutrientes como el fósforo.

En relación al índice R/V, resultan contradictorios los resultados de Smith (1980), citado en Azcón-Aguilar y Barea (1997). El autor señaló que la simbiosis micorrícica regula la tasa fotosintética y afecta el movimiento de fotosintatos a la raíz, resultando en índices R/V más bajos que los índices de los controles. En los resultados de este trabajo, el factor HMA no tuvo efecto significativo en el índice. Estas diferencias pueden deberse al tiempo que duró el experimento y al tamaño de las macetas, detalles que pudieron haber enmascarado el efecto del consorcio sobre el del índice R/V, pero más aún, la presencia de hongos micorrícicos nativos también puede explicar la falta de significancia ya que, como encontró Jansa *et al.* (2008), la combinación de dos o más hongos micorrícicos no producirá efectos mayores a los producidos por uno solo, excepto si se presenta una "complementaridad funcional".

La distribución de la biomasa en los órganos principales de la planta fue afectada significativamente por el tipo de fósforo aplicado y por las cepas inoculadas. En general, el fósforo insoluble produjo un índice R/V mayor que el fósforo soluble lo que puede ser una respuesta de la planta ante la poca disponibilidad del elemento. Morcuende *et al.* (2007) señalan que las deficiencias tanto de fósforo como de N, además de reducir el crecimiento general de la planta, provocan crecimiento preferencial de la raíz con lo que aumentan el índice R/V. Esto puede sugerir que las plantas fertilizadas con fósforo insoluble padecieron deficiencias de fósforo, pero de haber sido así, no sólo se habrían manifestado síntomas característicos en hojas y tallos, sino que además, los tratamientos control h(Pin)Cntrl y h(Ps)Cntrl habrían tenido medias significativamente diferentes. Sólo la cepa MET aumentó significativamente el índice R/V comparado con el control y en la Figura V.6 se observa que el efecto se presentó sin el consorcio y con la fertilización de fósforo insoluble. Aunque la diferencia no fue tan marcada como con la cepa MET, los resultados de cosecha que Adesemoye *et al.* (2008) obtuvieron en maíz presentaron un patrón similar pues el consorcio de *Bacillus* sp. produjo una cosecha mayor que la producida cuando se coinoculó con *Glomus intraradices*; sin embargo, los autores no mencionan si dicha diferencia fue significativa o no.

Ninguno de los factores tuvo efectos sobre la concentración interna de CO₂, la tasa de transpiración de las plantas o el número de hojas que produjeron, lo que parece indicar que, bajo las condiciones del experimento, estas variables son independientes de los factores que se evaluaron. Por otro lado la tasa fotosintética sí se vio afectada por el tipo de fertilización de fósforo y por la interacción que el consorcio y el tipo de fósforo mostraron. Dietz y Foyer (1986) encontraron que la fijación de CO₂ está relacionada con el Pi intracelular de la planta y dicha relación es directa (Raaimaker *et al.*, 1995). Las tasas fotosintéticas no se vieron

inhibidas por ninguno de los tratamientos y no se observaron síntomas característicos de deficiencia de fósforo. La observación de una tasa de fotosíntesis mayor cuando se aplicó fósforo insoluble no se explica fácilmente pues se esperaría que, dada la mayor facilidad de absorción del fósforo soluble, este tratamiento hubiera mostrado una mayor tasa de fijación de CO₂. Este es un asunto sobre el que sería interesante ahondar, tomando en consideración las interacciones con inoculantes.

La conductancia estomática está relacionada con el uso de agua por parte de la planta (Wheeler *et al.*, 1999) así como con el proceso fotosintético ya que se produce por la apertura o cierre de los estomas. La literatura habla que los estomas tienden a abrirse de forma gradual en el día, con un pico a medio día (Salisbury y Ross, 2000). Como referencia, el trabajo de Wheeler *et al.* (1999) mostró conductancias estomáticas que estuvieron por encima de 0.4 mol m⁻² s⁻¹, en plantas de papa y trigo, bajo concentraciones de CO₂ de 400 ppm. Los valores de conductancia estomática obtenidos en el ensayo de sorgo oscilaron entre 0.01 y 0.17 mol m⁻² s⁻¹ a pesar de haber sido tomados en horas cercanas a mediodía. Durante las mediciones de las variables fisiológicas se observaron temperaturas dentro de la cámara que oscilaron entre los 29 y los 35 °C aproximadamente. Salisbury y Ross (2000) señalan que la temperatura entre 30 a 35 °C provocan, generalmente, el cierre de los estomas por lo que se infiere que al hacer la medición, se sometió a las plantas a estrés térmico. La mayor conductancia que producida con la inoculación del consorcio no se acercó a las reportadas por Wheeler *et al.* (1999) y en general, ninguno de los tratamientos superó 0.15 mol m⁻² s⁻¹. Sin embargo, se puede pensar que en condiciones normales, el patrón de conductancia estomática se conservaría, pero aún si no es así, esta situación permitió observar la susceptibilidad de las plantas al estrés térmico y el efecto de los tratamientos sobre la respuesta.

V.2.4.2. Ensayo en lechuga

Para facilitar la exposición de los resultados, en los siguientes párrafos se hará mención de los factores y los tratamientos de forma sintética usando las abreviaturas mostradas en la Tabla V.4.

V.2.4.2.1. Biomasa de raíz. Se aplicó un ANOVA con los datos transformados mediante la función $\log_{10}(x)+1$. Se encontró que tanto los factores como la interacción tuvieron efectos significativos sobre la variable.

Se observó que inocular el consorcio produjo significativamente más biomasa de raíz que al no inocularlo. En general, 1.4N-P1, 5.10N-1, 5.10N-2 e ICA produjeron un incremento significativo de la raíz en comparación con tratamientos que carecían de bacteria. Al considerar todos los tratamientos, se observó que varias combinaciones produjeron biomásas de

Tabla V.4. Abreviaturas de factores e interacciones del ensayo de lechuga (*Lactuca sativa*).

Factores, Interacción y sus Abreviaturas	Niveles y Abreviaturas	Descripción
Hongo Micorrízico Arbuscular (HMA)	HMA (H) sin HMA (h)	Consortio inoculado Consortio no inoculado
Bacteria Solubilizadora de Fosfatos (BSF)	Cntrl 5.10N-1 5.10N-2 1.4N-P1 2.8N-GC1 2.8N-GC2 5.3N 3.9N 3.2N 1.9N SBP08 F3 ICA	Control cepa 5.10N-1 cepa 5.10N-2 cepa 1.4N-P1 cepa 2.8N-GC1 cepa 2.8N-GC2 cepa 5.3N cepa 3.9N cepa 3.2N cepa 1.9N cepa SBP08 cepa Fosfo III cepa ICA1001

raíz superiores a las de tratamientos sin inóculo bacteriano. Entre ellas destacan 5.10N-1 y 5.10N-2, ambas sin consorcio. Les siguen 2.8N-GC1, 2.8N-GC2, SBP08 y 1.4N-P1, todas con el consorcio. Las biomásas de raíz producidas por 1.9N, 3.2N, 5.3N y F3 no presentaron diferencias con los controles. La biomasa de raíz más baja observada se dió con la cepa 2.8N-GC1 cuando se inoculó sin el consorcio, siendo significativamente menor al resto. Cabe destacar la importancia que jugó el consorcio en los efectos que las diferentes cepas tuvieron sobre la variable considerada, pues en más de la mitad afectó significativamente la biomasa de raíz producida por los tratamientos (Figura V.9).

V.2.4.2.2. Biomasa de vástago. El ANOVA indicó que sólo los factores, y no la interacción, presentaron efectos significativos sobre la variable. La biomasa en vástago se vio promovida significativamente cuando se inoculó el consorcio, en comparación a las plantas no inoculadas con él. En cuanto a las cepas aplicadas, se encontró que poco más de la mitad produjeron biomásas de vástago significativamente menores que el control. Las cepas 1.4N-P1, 1.9N, 5.10N-1, 5.3N y F3 no mostraron diferencias con el tratamiento sin bacteria.

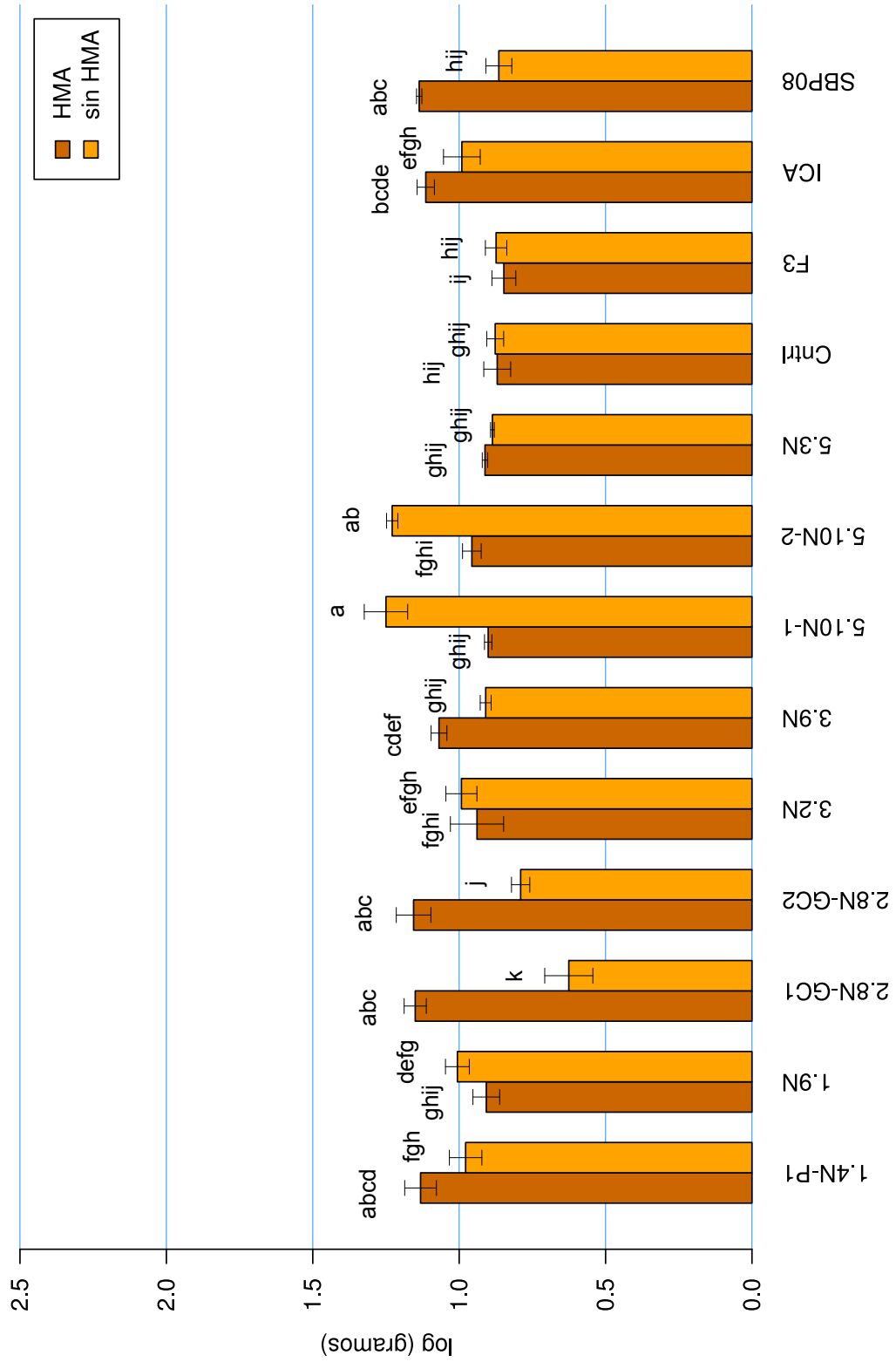


Figura V.9. Medias de Biomasa de raíz. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (prueba protegida de Fisher). Las líneas representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

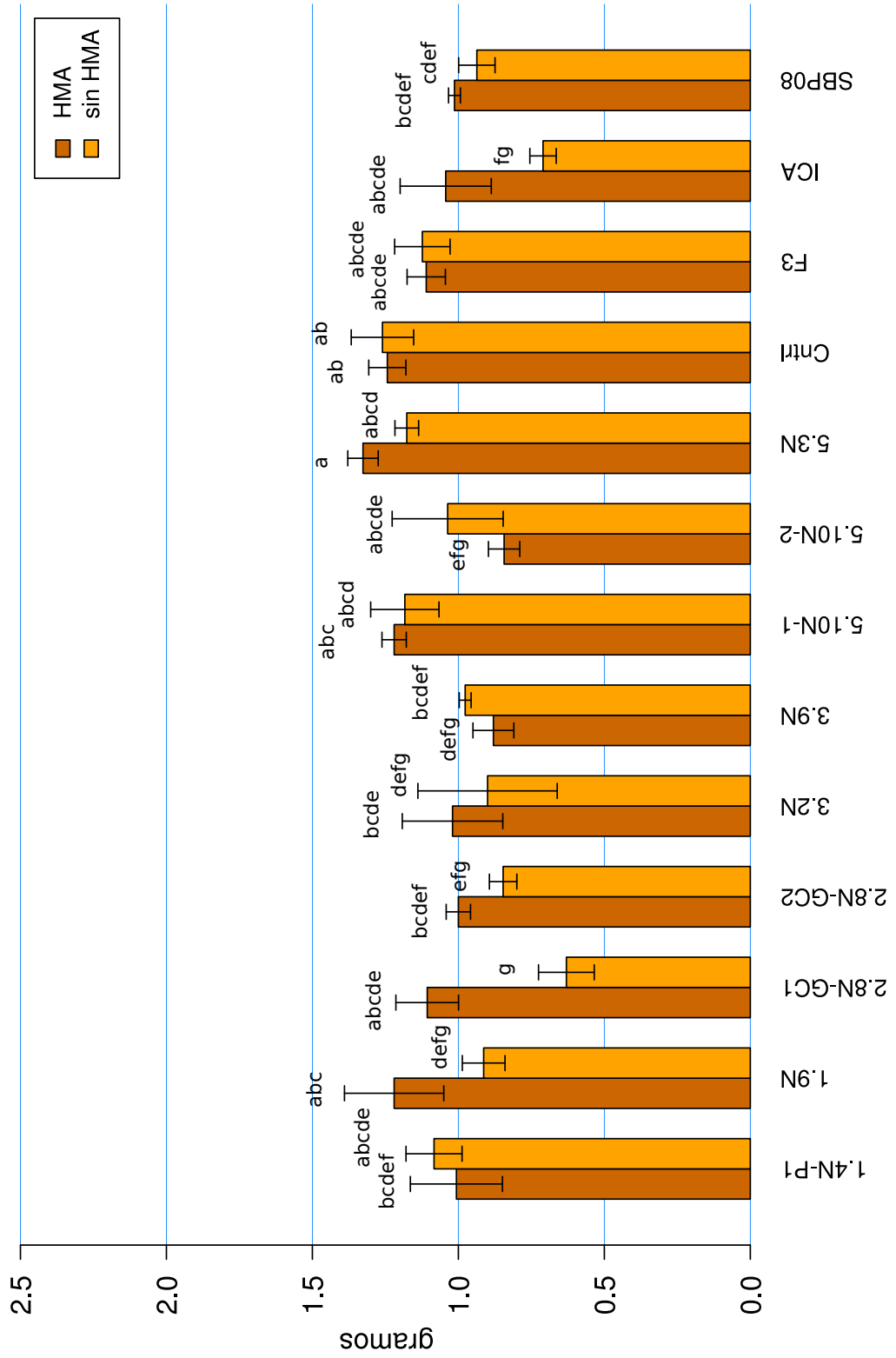


Figura V.10. Medias de Biomasa de vástago. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (prueba protegida de Fisher). Las líneas representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

V.2.4.2.3. Biomasa total. El ANOVA mostró que tanto los factores como la interacción tuvieron efectos significativos sobre la variable. Nuevamente, la biomasa total producida por el consorcio fue significativamente mayor que si no se aplicó. Así mismo, las cepas no presentaron diferencias con el tratamiento sin bacteria, con la excepción de 5.10N-1, que produjo una biomasa significativamente mayor. La interacción de las cepas con el consorcio presentó pocas diferencias con los tratamientos sin bacteria pues sólo las cepas 5.10N-1 y 5.10N-2 produjeron biomazas significativamente mayores que dichos tratamientos, aunque sólo cuando no se inocularon con el consorcio.

También se observó que el consorcio influenció el efecto de las cepas aún y cuando la biomasa producida no fuera siempre mayor que los tratamientos sin bacteria. Por ejemplo, la cepa 2.8N-GC1 produjo significativamente más biomasa cuando se aplicó con el consorcio que sola y lo mismo se observó en 2.8N-GC2, ICA y SBP08 (Figura V.11).

V.2.4.2.4. Volumen radical. Se hizo un ANOVA con los datos transformados mediante rangos alineados y se encontró que el factor BSF y la interacción de los factores tuvieron efectos significativos sobre el volumen de la raíz. Cinco de las cepas estimularon el volumen de la raíz de forma significativa, comparados con el producido cuando no se aplicó el inóculo bacteriano: 1.4N-P1, 1.9N, 3.2N, 5.10N-1 y 5.10N-2. La interacción mostró contrastes importantes en los efectos de las cepas al aplicarse con el consorcio. Algunas mostraron volúmenes significativamente mayores cuando se aplicaron junto con el consorcio, mientras que otras lo hicieron cuando se aplicaron solas. Ninguna cepa produjo volúmenes mayores que el tratamiento al que se aplicó el consorcio, pero sin inóculo bacteriano (Figura V.12).

V.2.4.2.5. Índice Raíz/Vástago. Se hizo un ANOVA con los datos transformados mediante la función $\log_{10}+1$. Luego del análisis se encontró que sólo el factor BSF y la interacción tuvieron efectos significativos. El índice observado cuando no se aplicó inóculo bacteriano fue significativamente menor que el de la mayoría de las cepas, con excepción de F3 y 5.3N. Pero al considerar la interacción con el consorcio, no se observó eso en todos los casos. Algunas cepas mostraron índices mayores al inocularse solas, mientras que otras, al aplicarse junto con el consorcio (Figura V.13).

V.2.4.2.6. Discusión. La inoculación con hongos micorrícicos promovió significativamente tres variables de biomasa. Este resultado coincidió con los de autores mencionados antes (Adesemoye *et al.*, 2008; Jansa *et al.*, 2008; Sailo y Bagyaraj, 2006). Aunque se usó un inóculo menos concentrado (0.27 Abs 640 nm) que los empleados por Cattelan *et al.* (1999) (0.55 Abs 600 nm), las cepas afectaron todas las variables medidas, de forma significativa.

Sin embargo, también se observó evidencia que parece sugerir que el hongo micorrícico no solubiliza fósforo del suelo. Al comparar estos resultados con los obtenidos en sorgo, parece que *Lactuca sativa* fue más susceptible a las cepas ensayadas, lo que pudo estar relacionado con el tipo de exudados que secretó cada cultivo (Loon, 2007; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Podile y Kishore, 2006); sin embargo, hay que recordar que las condiciones de fósforo en el sustrato también fueron distintas. Parece que las cepas evaluadas tienen efectos cuando el sustrato tiene reservas de fósforo insoluble, mientras que cuando el suelo carece de tales reservas, el efecto no se presenta (o lo hizo de forma imperceptible para el diseño usado).

Aunque la biomasa total no se vio muy alterada, la distribución de ésta en los principales órganos de la planta varió significativamente dependiendo de la cepa. En general, la mayoría de ellas alteró la distribución de la biomasa promoviendo preferentemente el crecimiento de la raíz. Dada la importancia de este órgano en la absorción de nutrientes y agua (Salisbury y Ross, 2000), el efecto es de relevancia para la salud de la planta en condiciones de estrés (Penrose y Glick, 2003).

En la interacción de los factores se observó que hubo efectos sinérgicos pues algunas cepas produjeron efectos mayores cuando se inocularon con el consorcio. También hubo casos en los que la cepa presentó mayores efectos cuando se inoculó sola. Los efectos del consorcio variaron dependiendo de la cepa con la que se inoculó produciendo efectos mayores en unos casos y similares en otros (respecto de los controles). El trabajo de Adesemoye *et al.* (2008) sugiere que este tipo de interacciones depende de las condiciones del sustrato.

Los tratamientos no produjeron respuestas parecidas entre volumen y la biomasa de raíz, lo que sugiere que se trata de respuestas independientes. El factor BSF presentó mayores contrastes que la interacción bajo las condiciones del ensayo, lo que parece respaldar la posibilidad de que los efectos se potencien cuando el sustrato tiene reservas de fósforo. Los resultados mostraron, en general, una tendencia a generar volúmenes de raíz mayores al control. Esta variable en particular presentó una variación muy elevada en cada uno de los tratamientos, lo cual se debió principalmente a la forma en que se midió. Puede ser una variable más útil cuando se trabaja con raíces de gran tamaño, pero es poco informativa cuando los volúmenes son tan pequeños como los observados en este ensayo.

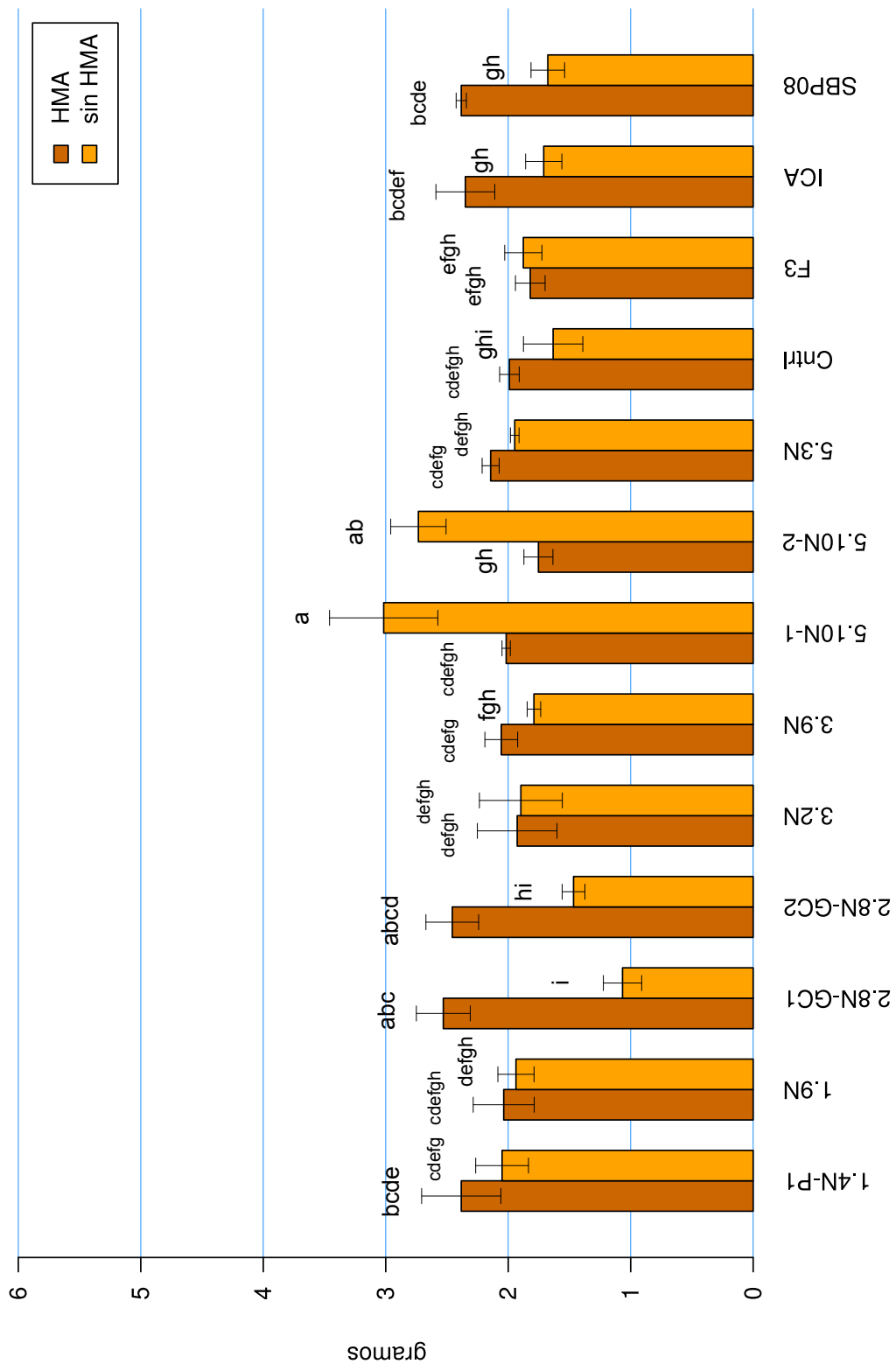


Figura V.11. Medias de Biomasa total. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (prueba protegida de Fisher). Las líneas representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

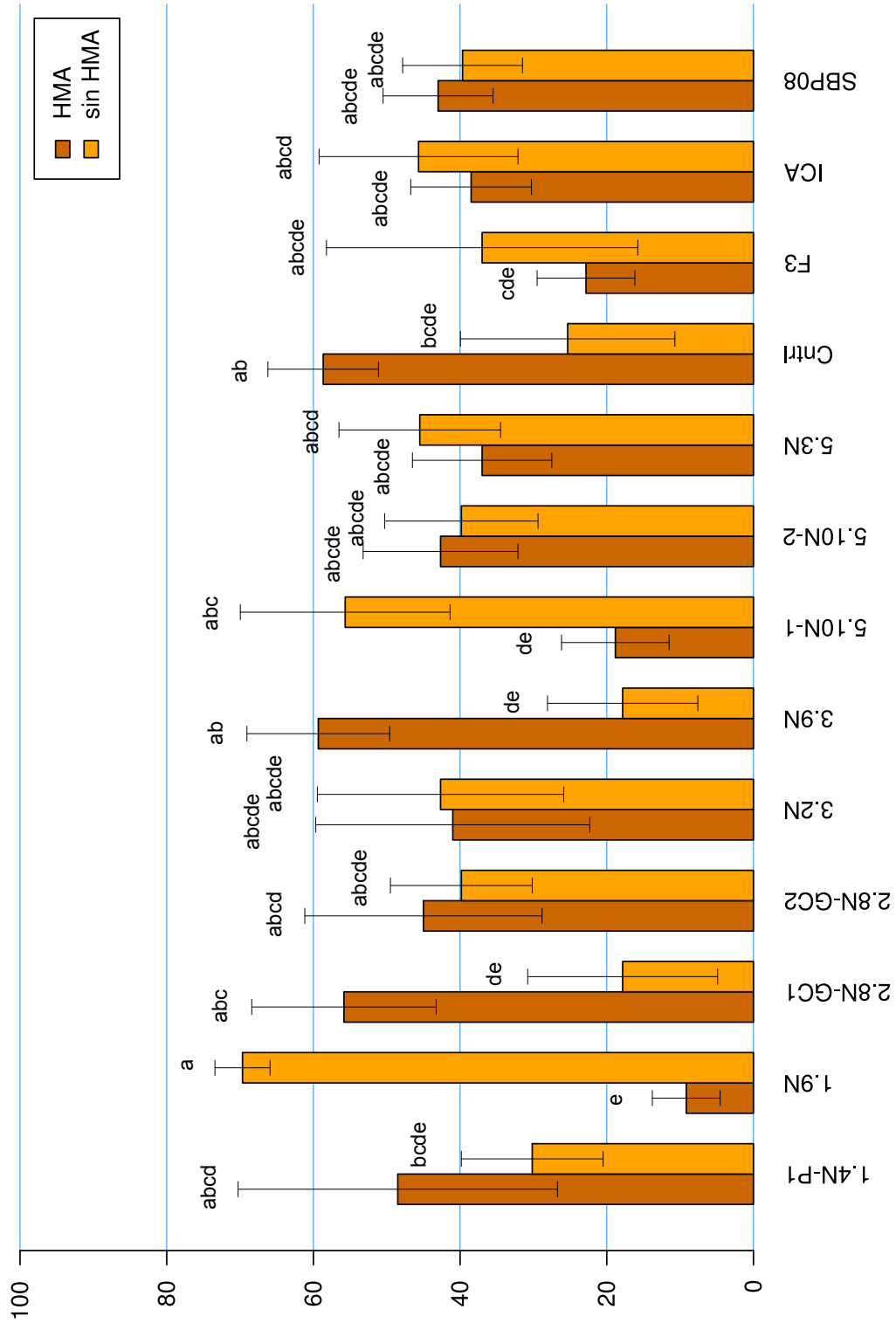


Figura V.12. Medias de rangos del Volumen radical. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (prueba protegida de Fisher). Las líneas representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

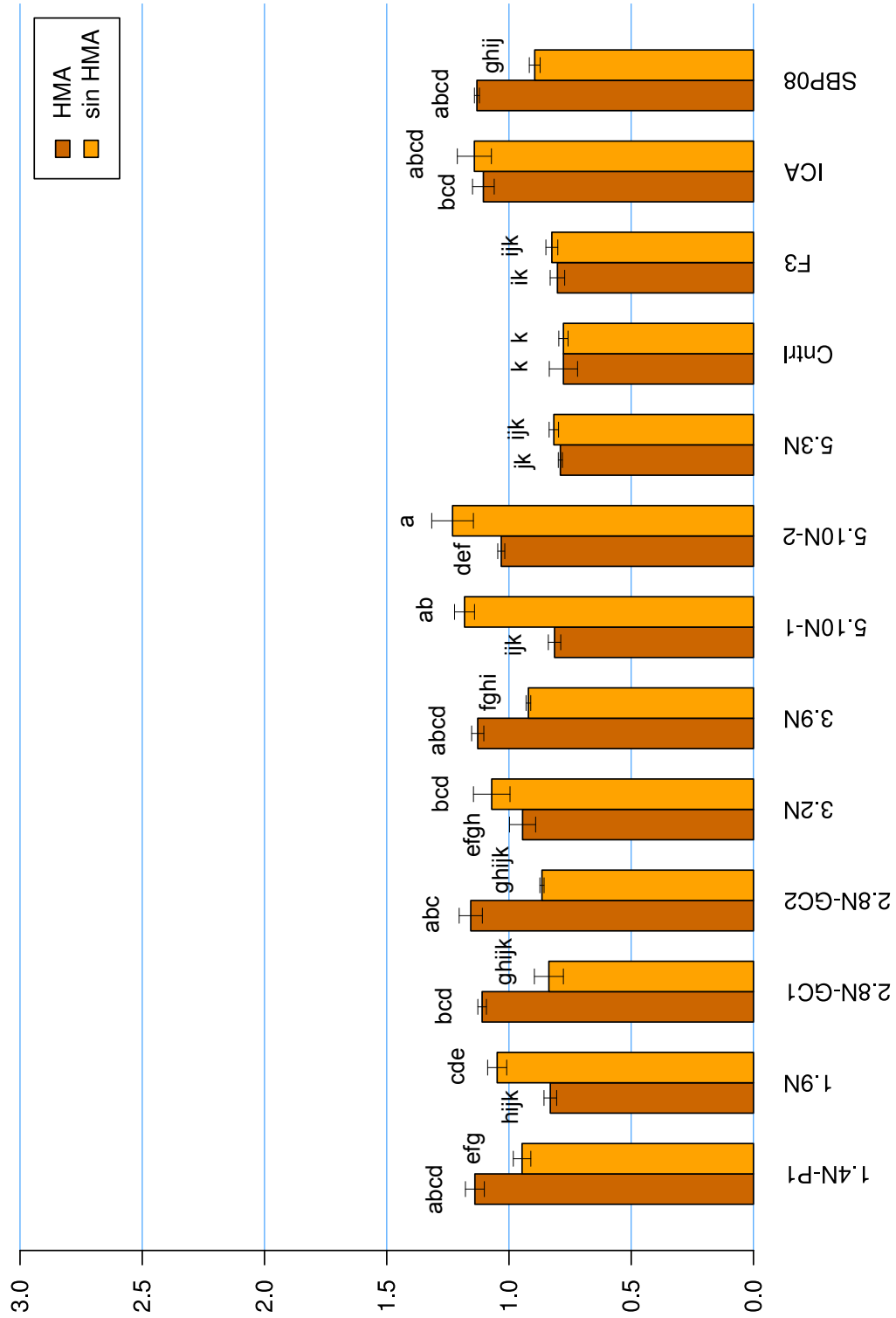


Figura V.13. Medias los rangos del índice Raíz/Vástago. La variable se transformó mediante la función $\log_{10}(x)+1$. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes (prueba protegida de Fisher). Las barras representan el error estándar de la media ($S_{\bar{x}}$).

V.3. Discusión general

En el presente trabajo se cumplió con el objetivo general: se logró aislar bacterias de sustrato calcáreo capaces de solubilizar fósforo en su medio a partir de sales insolubles. También se logró determinar de forma cuantitativa esta habilidad usando un método colorimétrico. Igualmente, se determinó si eran capaces de degradar el ACC, lo que evidenció su potencial para regular los niveles de etileno en un hospedero vegetal. Finalmente, gracias a los ensayos en invernadero, se pudieron observar los efectos *in vivo* de las cepas seleccionadas así como su interacción con otros microorganismos benéficos bajo condiciones de sustrato diferentes.

La mayor parte de las bacterias caracterizadas fueron capaces de solubilizar compuestos insolubles de fósforo, lo es congruente con una parte de la hipótesis de este trabajo. En cuanto a los rasgos de promoción, se observó que tales efectos están, al menos en parte, determinados por el tipo de cepa, el hospedero, la interacción con otros microorganismos y la disponibilidad del fósforo en el sustrato.

Aunque sería apropiado hacer más pruebas, los resultados de este trabajo justifican la búsqueda, selección e implementación de microorganismos capaces de solubilizar fósforo como una forma complementaria de fertilización que, además de los beneficios nutricionales mencionados en la literatura, puede producir efectos fisiológicos y de crecimiento deseables en hospederos vegetales.

Bibliografía

- Adesemoye, A., Torbert, H. y Kloepper, J. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. En: *Microb Ecol*, 58: 921-929.
- Adesemoye, A., Torbert, H. y Kloepper, J. 2008. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. En: *Can. J. Microbiol.* 54: 876-886.
- Anónimo. 1999. Enciclopedia Práctica de la Agricultura y la Ganadería. Ed. por C. Gisbert *et al.* OCEANO/CENTRUM.
- Arcand, M. y Schneider, K. 2006. Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. En: *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 78 (4): 791-807.
- Arzuaga, S., Fernández López, C., Dalurzo, H. y Vazquez, S. 2005. «Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa ácida, en Entisoles, Alfisoles y Vertisoles de Corrientes con diferentes usos agrícolas». En: *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*.
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. En: *Scientia Horticulturae*, 68: 1-24.
- Azcón-Aguilar, C., Gianinazzi-Pearson, V. y Fardeau, J. 1986. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria on growth and nutrition of soybean in a neutral-calcareous soil amended with ^{32}P - ^{45}Ca -tricalcium phosphate. En: *Plant and Soil*, 96: 3-15.
- Barraco, M., Díaz-Zorita, M. y Álvarez, C. 2007. Aplicaciones incorporadas y al "voleo" de fósforo en el cultivo de maíz en la Región de la Pampa Arenosa. En: *Informaciones Agronomicas*, 3: 17-19. URL: [http://www.ipni.net/ppiweb/iaarg.nsf/\\$webindex/B55CFE9D4E9B605103257341005CF06A/\\$file/4.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/iaarg.nsf/$webindex/B55CFE9D4E9B605103257341005CF06A/$file/4.pdf).
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. En: *Biotechnology advances*, 16: 729-770.

- Bieleski, R. L. 1973. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. En: Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 225-252.
- Cajuste, L. J. 1980. QUÍMICA DE SUELOS CON UN ENFOQUE AGRÍCOLA. Ed. por C. D. POSTGRADUADOS. SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRÁULICOS.
- Calvo-Vélez, P., Reymundo-Meneses, L. y Zúñiga-Dávila, D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. En: Ecología Aplicada, 7(1,2): 141-148.
- Cattelan, A., Hartel, P. y Fuhrmann, J. 1999. Screening for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. En: Soil Sci. Soc. Am. J. 63: 1670-1680.
- Cotton, F. A. y Wilkinson, G. 1976. Basic inorganic chemistry. JOHN WILEY & SONS. New York.
- Dietz, K.-J. y Foyer, C. 1986. The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves: reversibility of the effects of phosphate deficiency on photosynthesis. En: Planta, 167: 376-381.
- Dworkin, M. y Foster, J. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. En: J Bacteriol, 75: 592-601.
- Fernández, L., Zalba, P., Gómez, M. y Sagardoy, A. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. En: CI. Suelo (Argentina), 23 (1): 31-37.
- Figueiredo, M., Martinez, C., Burity, H. y Chanway, C. 2008. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) En: World J. Microbiol Biotechnol, 24: 1187-1193.
- Fox, J. y Weisberg, S. 2010. An R Companion to Applied Regression. Second. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>.
- Fox, J., Liviu Andronic, with contributions from, Ash, M., Boye, T., Calza, S., Chang, A., Grosjean, P., Heiberger, R., Kerns, G. J., Lancelot, R., Lesnoff, M., Ligges, U., Mesad, S., Maechler, M., Muenchen, R., Murdoch, D., Neuwirth, E., Putler, D., Ripley, B., Ristic, M., y Wolf., P. 2009. Rcmdr: R Commander. 2009. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=Rcmdr>. R package version 1.6-2.

- Foyer, C. y Spencer, C. 1986. The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves: effects on intracellular orthophosphate distribution, photosynthesis and assimilate partitioning. En: *Planta*, 167: 369-375.
- García Trejo, A. 1984. Experimentos en microbiología del suelo. CECSA.
- Glick, B. R. y Penrose, D. M. 2004. «Plant Surface Microbiology». En: ed. por A. Varma *et al.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Cap. The use of ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria to protect plants against the deleterious effects of ethylene, págs. 133-144.
- Goldstein, A. 1994. «Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria». En: ed. por A. Torriani-Gorini *et al.* ASM Press, Washington, D.C. Cap. 33, págs. 197-203. URL: <http://goo.gl/x5Z2Z>.
- Hammond, J., Broadley, M. r. y White, P. J. 2004. Genetic Responses to Phosphorus Deficiency. En: *Annals of Botany*, 94: 323-332.
- INEGI. 2010. *Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática*. Español. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. URL: <http://www.inegi.org.mx/default.aspx>.
- Jackson, M. 1982. Análisis Químico de Suelos. 4 ed. Ed. OMEGA, S.A. Barcelona. Cap. Cap. 7, págs. 190-253.
- Jansa, J., Smith, F. A. y Smith, S. E. 2008. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? En: *New Phytologist*, 177: 779-789.
- Jorquera, M. A., Hernández, M. T., Rengel, Z., Marschner, P. y Mora, M. d. I. L. 2008. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. En: *Biol Fertil Soils*, 44: 1025-1034.
- Kang, B. G., Kim, W. T., Yun, H. S. y Chang, S. C. 2010. Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Control Stress Responses of Plant Roots. En: *Plant Biotechnol Rep*, 4 (3): 179-183. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11816-010-0136-1>.
- Kausar, R. y Shahzad, S. M. 2006. Effect of ACC-deaminase Containing Rhizobacteria on Growth Promotion of Maize under Salinity Stress. En: *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 2: 216-218.

- Kloepper, J. W. y Schroth, M. 1978. «Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes». En: *Station de Pathologie vegetale et Phyto-bacteriologie*. Ed. por P. of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Vol. II.
- Kochian, L. V., Hoekenga, O. A. y Piñeros, M. A. 2004. How do crop plants tolerate acid soils?: Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. En: *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 459-93.
- Loon, L. van. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. En: *Eur J Plant Pathol*, 119: 243-254.
- Lugtenberg, B. y Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. En: *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I. y Valencia-Cantero, E. 2007. *Bacillus megaterium* Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture Through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. En: *The American Phytopathological Society*, 20 (No. 2): 207-217.
- Madigan, M. T., John M., M. y Jack, P. 2006. *Biología de los Microorganismos*. 10° ed. PEARSON Prentice Hall. México.
- Martin, A. 1980. *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT EDITOR, S.A.
- Mendiburu, F. de. 2010. agricolae: Statistical Procedure for Agricultural Research. 2010. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>. R package version 1.0-9.
- Morcuende, R., Bari, R., Gibon, Y., Zheng, W., Datt Pant, B., Bläsing, O., Usadel, B., Czechowski, T., Udvardi, M. K., Stitt, M. y Scheible, W.-R. 2007. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. En: *Plant Cell Environ.* 30: 85-112.
- Ortíz-Castro, R., Valencia-Cantero, E. y López-Bucio, J. 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. En: *Plant Signaling & Behavior*, 3:4: 263-265.
- Penrose, D. y Glick, B. 2003. Method for isolation and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. En: *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 118: 10-15.
- Podile, A. R. y Kishore, G. K. 2006. «Plant-Associated Bacteria». En: ed. por S. S. Gnana-manickam. Springer Netherlands. Cap. 6. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, págs. 195-230.

- Quinn, G. P. y Keough, M. J. 2003. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge university Press. Cap. 9.
- Raaimaker, D., Boot, R., Dijkstra, P., Pot, S. y Pons, T. 1995. Photosynthetic rates in relation to leaf phosphorus in pioneer versus climax tropical rainforest trees. En: *Oecologia*, 102: 120-125.
- Rodríguez, H. y Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. En: *Biotechnology Advances*, 17: 319-339.
- Sailo, G. L. y Bagyaraj, D. 2006. Influence of *Glomus bagyarajii* and PGPRs on the Growth, Nutrition and Forskolin concentration of *Coleus forskohlii*. En: *Biological Agriculture and Horticulture*, 23: 371-382.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussarin, S. y Bhatti, A. S. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. En: *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34: 635-648.
- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. 2000. *Fisiología de las Plantas 1. Células: agua, soluciones y superficies*. Ed. por M. T. Gómez-Mascaraque Pérez. PARANINFO. THOMSON LEARNING. México.
- Sharma, K., Dak, G., Agrawal, A., Bhatnagar, M. y Sharma, R. 2007. Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on the Germination of *Cicer arietinum* seeds and seedling growth. En: *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 1 (1): 61-63.
- Smith, S. 1980. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. En: *Biol. Rev.* 55: 475-510.
- Team, R. D. C. 2009. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2009. URL: <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.
- Toro, M., Azcón, R. y Barea, J. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (^{32}P) and nutrient cycling. En: *Applied and environmental microbiology*, Nov. 4408-4412.
- Vassilev, N., Vassileva, M. y Nikolaeva, I. 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. En: *Appl Microbiol Biotechnol*, 71: 137-144.
- Villee, C., Eldra, P., Linda, B. y Diana, M. 1998. *Biología de Ville*. McGraw-Hill Interamericana.

- Wheeler, R. M., Mackowiak, C. L., Yorio, N. C. y Sager, J. C. 1999. Effects of CO₂ on Stomatal Conductance: Do Stomata Open at Very High CO₂ Concentrations? En: *Annals of Botany*, 83: 243-251.
- Wolfe-Simon, F., Switzer-Blum, J., Kulp, T. R., Gordon, G. W., Hoefl, S. E., Pett-Ridge, J., Stolz, J. F., Webb Samuel M. and Weber, P. K., Davies, P. C., Anbar, A. D. y Oremland, R. S. 2011. A Bacterium that can Grow by Using Arsenic instead of Phosphorus. En: *Science*, 332: 1163-6. doi: 10.1126/science.1197258. URL: <http://www.sciencemag.org/content/early/2010/12/01/science.1197258.abstract>.
- Zhu, P.-M., Yang, X.-M., Xu, Y.-C., Ouyang, H. y Shen, Q.-R. 2007. High effective phosphate solubilizing bacteria: Their isolation and promoting effect on corn seedling growth. En: *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18: 107-112.