



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

**FACULTAD DE INGENIERÍA
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

Adición de enzimas fosfatasas y fitasas en composta madura para el aumento de Fósforo disponible para la Agricultura.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Ingeniero Agroindustrial

PRESENTA:

Mayra Lizeth Uribe Basilio

DIRIGIDA POR:

M.C. Adrián Esteban Ortega Torres

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

Adición de enzimas fosfatasa y fitasa en composta madura para el aumento de Fósforo disponible para la Agricultura.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Ingeniero Agroindustrial

Presenta:

Mayra Lizeth Uribe Basilio

Dirigido por:

Adrián Esteban Ortega Torres

M.C. Adrián Esteban Ortega Torres
Presidente

Dr. Enrique Rico García
Secretario

Dr. Irineo Torres Pacheco
Sinodal

M.C. Arturo Arana Juaristi
Vocal

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad de Ingeniería

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre 2021

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, por el apoyo en esta maravillosa etapa.

A mis hermanas por y para ustedes, el motivo de cada una de mis metas.

A la persona que siempre estuvo y estará, cada logro y tropiezo, por motivarme a ser mejor, a ti Ramiro Morales Ruiz.

A mis amigos por las experiencias compartidas.

Dr. Adrián Esteban Torres por los consejos, conocimientos y apoyo incondicional.

Gracias.

Mayra Lizeth Uribe Basilio.

RESUMEN

El Fósforo (P) es uno de los elementos más importantes en la Agricultura ya que forma parte múltiples reacciones metabólicas de las plantas por lo que su presencia es esencial en la Agricultura. La forma de adición de P a la planta es por medio de fertilizantes fosfatados, su obtención industrial es mediante la extracción de roca fosfórica, se encuentra el 83% del total de la roca en tres países, por lo que los cambios de precio y la disponibilidad hacen dependiente al resto del mundo. Una vez que es aplicado el fertilizante fosfatado, un 75-90% es precipitado y absorbido por otros elementos, conocidos como fijadores de P. Los fijadores de P y las fuentes de roca fosfórica, intensifican la búsqueda de nuevos métodos de obtención de P como lo es el compostaje. En el compostaje el P se encuentra en su mayoría en forma orgánica que no es disponible para las plantas, las cuales lo aprovechan en su forma inorgánica, este proceso en el compostaje es realizado por microorganismos. Existen antecedentes del uso de enzimas provenientes de microorganismos del suelo que degradan distintos compuestos en composta madura.

En el presente trabajo, se utilizó la bacteria solubilizadora de fosfatos *Pseudomonas aeruginosa* a la cual se le evaluó su actividad enzimática de P en diferentes medios de cultivo, se determinó los primeros tratamientos del primer experimento en la aplicación en la composta madura para obtener P disponible. Del mejor tratamiento que se obtuvo se incrementó la concentración de su aplicación en composta madura. Los resultados del primer experimento en el medio de cultivo de papa dextrosa (PDB) el sobrenadante que contenía un mix de enzimas fitasas, fosfatasas neutras, ácidas y alcalinas, obtuvo una conversión de P orgánico a disponible 20% más que el control. En el incremento de concentración de este tratamiento se obtuvo un 60% más de disponibilidad de P.

Este trabajo se realizó con el fin de utilizar enzimas que mineralizan el P, para evitar la complejidad entre los residuos y los microorganismos endémicos de la composta. Los resultados obtenidos del incremento de porcentaje de P disponible por medio de las enzimas cultivadas in-vitro es alentador ya que puede ser escalable para países que no dispongan de P y si de residuos.

Palabras clave: Medios mínimos de cultivo, actividad específica, mineralización.

SUMMARY

Phosphorus (P) is one of the most important elements in Agriculture since it is part of multiple metabolic reactions of plants, so its presence is essential in Agriculture. The form of addition of P to the plant is by means of phosphate fertilizers its industrial obtaining is by means of the extraction of phosphoric rock, 83% of the total is found in a single country, so price changes and availability makes dependent on the rest of the world. Once the phosphate fertilizer is applied, 75-90% is precipitated and absorbed by other elements, known as P.

P fix actives and phosphate rock sources intensify these arches for new methods of obtaining P such as composting. In P composting it is found mostly in an organic form that is not available to plants, which take advantage of it in its inorganic form, this process in composting is carried out by microorganisms.

There is a history of the use of enzymes from soil microorganisms that degrade different compounds in mature compost.

In the present work, the phosphate-solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* was used, whose P enzymatic activity was evaluated in different culture media, the first treatments of the first experiment were determined in the application in the mature compost to obtain available P. From the best treatment that was obtained, the concentration of its application in mature compost was increased. The results of the first experiment in the potato dextrose broth (PDB) culture medium, the supernatant containing a mixture of phytase, neutral, acidic and alkaline phosphatases obtained a conversion of organic to available P 20% more than the control. In increasing the concentration of this treatment, 60% more availability of P.

This work was carried out in order to use enzymes that mineralize P, to avoid the complexity between the residues and the endemic microorganism of the compost. The results of the increase in the percentage of P available through in vitro cultured enzymes are encouraging since it can be scalable for countries that do not have P and do have residues.

Keywords: Phosphorus: Minimum culture media, specific activity, mineralization.

TABLA DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	10
II.	FUNDAMENTACIÓN TEORICA Y ANTECEDENTES.....	12
2.1	Ciclo del fósforo en el suelo.....	12
2.2	Residuos Orgánicos.....	133
2.3	Compostaje.....	144
2.3.1	Fase Mesófila.....	155
2.3.2	Fase Termófila o de Higienización.....	166
2.3.3	Fase de Enfriamiento o Mesófila II.....	166
2.3.4	Fase de Maduración.....	177
2.4	Mineralización del Fósforo.....	177
2.5	Bacterias Solubilizadoras de Fósforo (PSB).....	188
2.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> como Solubilizadora de Fosfato.....	188
2.7	Enzimas.....	199
2.8	Enzimas Fitasas.....	199
2.9	Enzimas Fosfatasas.....	20
2.10	Método de Interacción de Enzimas.....	20
2.11	Antecedentes actuales de trabajos de adición de enzimas y evaluaciones en Plantas.....	211
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	211
3.1	Hipótesis.....	211
3.2	Objetivo General.....	211
3.3	Objetivos Particulares.....	222
IV.	METODOLOGÍA.....	222
4.1	Localización de área de estudio.....	222
4.2	Evaluación de la actividad específica para la obtención de Fósforo disponible a partir de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en distintos medios de cultivo.....	222
4.2.1	Cinética de la Turbidiometría de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de caldo de papa dextrosa.....	222
4.2.2	Actividad específica y Unidades Formadoras de colonia (UFC) de <i>P. aeuroginosa</i> en medio de fitato de sodio y PDB.....	233
4.2.2.1	Determinación de la unidad enzimática.....	233
4.2.2.2	Determinación de la concentración de proteína.....	233
4.2.2.3	Obtención de actividades enzimáticas específicas.....	244
4.3	Análisis de diferentes estrategias del uso de <i>P.aeruginosa</i> para aumentar la disponibilidad de Fósforo en composta madura.....	244
4.3.1	Preparación de prueba experimental.....	244

4.3.2 Primer Experimento de adición de solubilización de fósforo en composta madura.....	244
4.4 Adición de una mezcla enzimática con incrementos de porcentaje cada 20% en relación volumen (sobrenadante) y peso (composta madura) para aumentar el Fósforo disponible.	266
4.5 Análisis estadísticos.....	266
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	277
5.1 Evaluación de la actividad específica para la obtención de Fósforo disponible a partir de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en distintos medios de cultivo.....	277
5.1.1 Resultado de la turbidimetría de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en caldo de papa dextrosa.....	277
5.1.2. Actividad específica y Unidades Formadoras de colonia (UFC) de <i>P.aeruginosa</i> en medio de fitato de sodio y caldo de papa dextrosa	288
5.2 Resultados de Primer Experimento de adición de solubilización de fósforo en composta madura.....	299
5.3 Resultado de la adición del incremento del porcentaje de la mezcla enzimática cada 20% al 100% en composta madura para aumentar el Fósforo disponible.....	311
VI. CONCLUSIONES.....	322
VII. RECOMENDACIONES Y FUTURAS INVESTIGACIONES.....	333
VIII.- REFERENCIAS.....	333

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resultados de la actividad específica en PDB de la PSB	29
<i>P. aeruginosa</i>	
Tabla 2 Promedios de los tratamientos con mayor liberación de	29
P Olsen de la composta madura	

Dirección General de Bibliotecas UAQ

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones entre el ciclo de fósforo y los compartimientos orgánicos y minerales	13
Figura 2. Esquema conceptual del proceso de compostaje	15
Figura 3. Preparación experimental para el incremento de P disponible en composta	24
Figura 4. Diseño factorial incompleta de adición de tratamientos en solubilización de P disponible en composta	25
Figura 5. Aplicación de los tratamientos humedeciendo homogéneamente la composta (50 gr)	26
Figura 6. Resultados del crecimiento de bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en medio de Papa Dextrosa.	28
Figura 7. Resultados del análisis estadístico de tratamientos a las 24, 48 y 72 horas de aplicación.	30
Figura 8. Resultados de análisis estadístico de tratamientos con concentración mayor al 20%.	32

I. INTRODUCCIÓN.

Cada día se pierden suelos por erosión hídrica, erosión eólica, pérdida de estructura, pérdida nutrimental, por el uso excesivo de fertilizantes y plaguicidas, monocultivos y la explotación exhaustiva (Lougheed, 2011; Guadarrama *et al.*, 2018). Por otra parte el Fósforo (P) forma parte de los macronutrientes primarios, solo puede ser añadido físicamente en forma de fertilizante, es un elemento esencial para diferentes reacciones metabólicas y desarrollo de las plantas, tiene una relación simbiótica con microorganismos y protección contra patógenos (Guijarro, 2018). No hay un elemento natural o sintético que pueda sustituirlo por lo que es de gran importancia su presencia en los suelos agrícolas. La obtención de los fertilizantes fosforados es mediante la extracción de roca fosfórica, de las cuales el 93% se sitúan principalmente en seis países del mundo como lo son; Marruecos, China, Argelia, Sudáfrica y Jordania, de este porcentaje el 83% se halla exclusivamente en Marruecos, esto implica que cualquier país que dependa de las importaciones de fertilizantes sea vulnerable a la disponibilidad y al cambio de los precios (Lougheed, 2011).

Una vez aplicado el fertilizante fosforado comienzan las relaciones fisicoquímicas con el suelo donde su disponibilidad se reduce rápidamente, de un 75-90% es precipitado y adsorbido por cationes de hierro (Fe), aluminio (Al) y calcio (Ca) (Barbieri *et al.*, 2018), otra parte del P es adherido a las arcillas, todas estas características son llamadas fijadores de P (Barrow, 2017).

Debido a los fijadores de P y las fuentes de roca fosfórica limitadas, se han buscado productos que puedan servir de sustituto de manera completa, permitiendo la accesibilidad y que puedan proporcionar la cantidad de P necesario para el desarrollo de la planta. Uno de los mejores sustituyentes se encuentra en los residuos orgánicos, material proveniente de flora y fauna que

mediante microorganismos degradan y producen composta, bajo diferentes condiciones de temperatura, humedad y relación Carbono-Nitrógeno (C-N)(Pilar, 2013). En el compostaje un aspecto importante es la mineralización, en el que los microorganismos (bacterias y hongos) mediante la maquinaria enzimática, obtienen la energía para llevar a cabo todos los procesos metabólicos, rompiendo enlaces de compuestos orgánicos provenientes de los residuos (Cardona, 2017), para transformarlos a moléculas inorgánicas (Pilar,2013). Existen microorganismos que segregan enzimas con potencial en la agricultura como las Bacterias Solubilizadoras de Fósforo (PSB por sus siglas en inglés), permitiendo la accesibilidad de este macro elemento que mediante reacciones oxidan a compuestos inorgánicos, que puede ser absorbido por plantas (Varma, 2017).

El uso e inoculación de PSB en la composta, tiene como limitante principal la supervivencia del inóculo(Feng et al., 2011).

Arun *et al.* (2017) reportaron el uso de enzimas ligninolíticas, que se añadieron de forma directa en el proceso de compostaje obteniendo una buena relación entre la enzima y la degradación de los compuestos ligninocelulósicos. López-Aizpun *et al.* (2018) evaluó la actividad enzimática (glucosidasas, nitrato reductasas, ureasas, proteasas, fosfatasas ácidas, deshidrogenasas) en un suelo de bosque cercano unas granjas de ganado, encontrando que la actividad enzimática es un buen indicador biológico de calidad en los suelos.

Basado en la evidencia del uso de enzimas en este trabajo se adicionó enzimas fosfatasas y fitasas de *Pseudomonas aeruginosa* (PSB) para incrementar la concentración de P disponible en el compostaje. Con el fin de integrar como en la composta una doble función de mejorar de la estructura del suelo y de nutrición de P.

II. FUNDAMENTACIÓN TEORICA Y ANTECEDENTES.

2.1 Ciclo del fósforo en el suelo.

El Fósforo (P) es un elemento principal, limitado y de baja biodisponibilidad, asimilado por las plantas en forma de Fosfatos, el residual se queda presente en el suelo, de 100 a 300 mg de P/kg (Rincón & Gutiérrez, 2012), puede perderse por el escurrimiento. El P que se incorpora a los seres vivos de la cadena trófica es reintegrado a los suelos y aguas subterráneas mediante la descomposición por microorganismos, para finalmente llegar a los sedimentos de roca y completar su ciclo. La fuente natural de P son depósitos de roca fosfórica, los cuales se encuentran principalmente en Marruecos, China y USA, siendo dependiente el resto del mundo de su extracción industrial para utilizarlo como fertilizante.

Una vez incorporado el P al suelo mediante fertilizantes, de un 15 a 80% se encuentra en formas orgánicas o fijado como fosfatos de Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} y Al^{3+} , dependiendo el pH del suelo, impidiendo la disponibilidad del P total para las plantas, principal causa de la deficiencia en cultivos siendo la consecuencia de baja productividad. Aunque el porcentaje de P asimilado por las plantas es muy bajo, cerca del 40% de P extraído se pierde como desechos animales (Rittmann *et al.*, 2011), por lo que la principal fuente de P orgánico en la actualidad es la mineralización bioquímica de residuos orgánicos de plantas y animales, dependientes de la actividad microbiana (García-oliva, 2013).

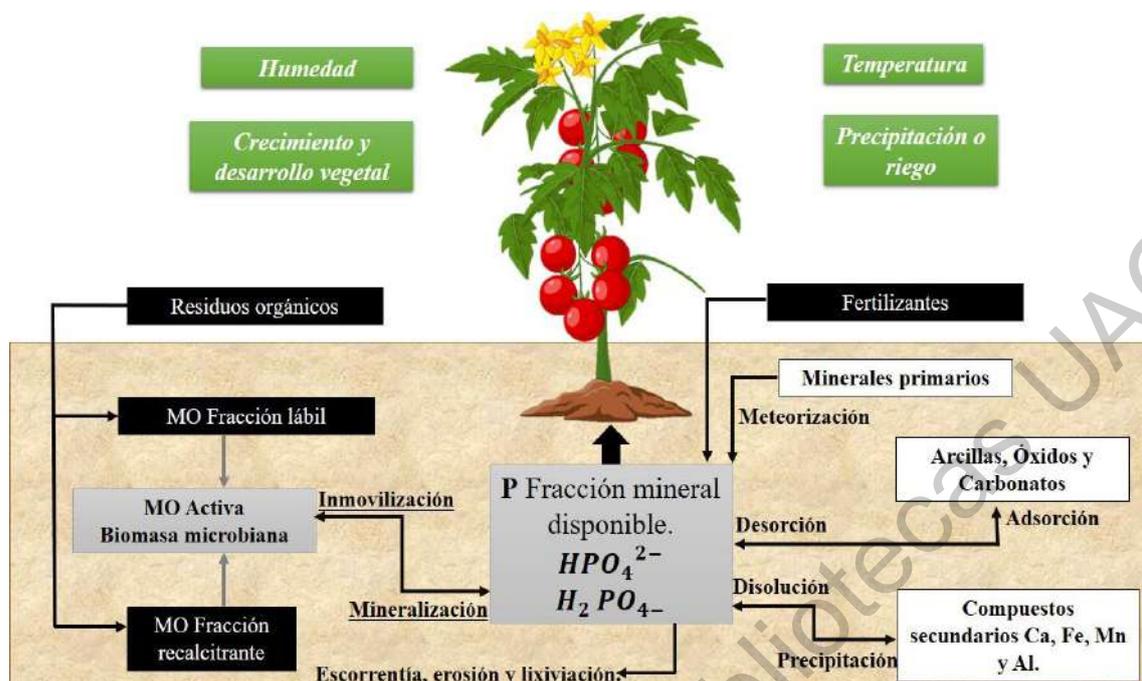


Figura 1. Relaciones entre el ciclo de fósforo y los compartimientos orgánicos y minerales. Los cuadros negros son las entradas al sistema, los grises las fracciones disponibles, blancos las fracciones minerales, cuadros verdes los procesos y factores que tienen influencia en la disponibilidad del fósforo. Modificado de Rincón (2012).

El ciclo del P se encuentra en una forma fracturada, debido a la dependencia de la agricultura a los depósitos de roca fosfórica (Rincón & Gutiérrez, 2012). Siendo nula las cantidades que pueden ser reincorporadas de forma biológica al sistema (Khan *et al.*, 2009), debido al exceso en su aplicación o a la baja capacidad microbiológica de transformarlo por reacciones que tiene el P con otros elementos a una forma no disponible en el medio donde fue aplicado, principalmente en los medios acuáticos y suelos (García-oliva, 2013). Una de las alternativas es la biomasa de los residuos orgánicos para poder obtener nutrientes que pueda utilizar la agricultura y en los cuales se encuentra una gran cantidad de P orgánico que no está siendo aprovechado.

2.2 Residuos Orgánicos.

Los Residuos Orgánicos representan en la actualidad una problemática mundial debido a la contaminación que representa la acumulación y su escaso

aprovechamiento. América de Norte genero una iniciativa para el desvío y procesamiento de residuos orgánicos con la Comisión para la Cooperación Ambiental(CCA)conformada por Estados Unidos, Canadá y México, informa que en conjunto los tres países generan cerca de 265 millones de toneladas de residuos orgánicos al año, de los cuales hay un aprovechamiento del 32% por parte de Estados Unidos y Canadá, en cuanto a México reporta cerca del 7% del aprovechamiento(CCA, 2017), mismo que consta de las técnicas de compostaje para ser destinado en diferentes productos o para la agricultura como parte de la estructura de suelo proporcionando múltiples beneficios. A pesar de las cifras dadas por la CCA las cantidades en la actualidad son mayores donde no hay reportes seguros, no existe un registro certero de la cantidad de residuos orgánicos, especialmente en México.

2.3 Compostaje.

Los residuos orgánicos al integrarse de manera directa al suelo por descomposición y adición es muy lenta, por lo que deben ser transformados mediante el compostaje donde intervienen microorganismos aerobios que actúan de manera sucesiva sobre la materia orgánica original bajo condiciones controladas; que pueden ser de dos tipos: los primeros son los parámetros de seguimiento que son (Tang Haillet *al.*, 2017); la temperatura, humedad, pH, aireación y espacio de aire libre. Los segundos son los parámetros relativos a la naturaleza de la materia orgánica los cuales deben ser adecuados al inicio del proceso como lo es el tamaño de la partícula, relaciones Carbono/Nitrógeno (C/N), nutrientes, materia orgánica y conductividad eléctrica (Tang Haillet *al.*, 2017). Estos parámetros permiten una correcta proliferación microbiana, con ello incrementar el proceso de compostaje (Cronje *et al.*, 2003).La mineralización es el proceso de degradación de un compuesto orgánico, inducida por microorganismos que exudan enzimas las cuales actúan específicamente sobre un sustrato particular(Frossard et al., 2011), con este proceso transforman las moléculas orgánicas mediante reacciones de oxidación e hidrolisis en moléculas inorgánicas de bajo peso molecular que son aprovechadas por las plantas (Monsalve, 2017). La calidad de la biomasa final denominada composta.

La composta añade al suelo múltiples beneficios a la estructura del suelo, facilitando labores de siembra, aumenta la retención de agua, reduce el riesgo de erosión, regula la humedad, aporta macro y micronutrientes, además de mejorar la actividad biológica (Romanet *al.*, 2015).

Si el proceso de compostaje no se realiza de manera adecuada, puede acarrear riesgos como lo es la fitotoxicidad, bloqueo biológico de nitrógeno, reducción de oxígeno radicular, exceso de amonio y nitratos en las plantas y contaminación de fuentes de agua (Román et al., 2013) La composta se divide en fases los cuales van en seguimiento con la diferencia en los parámetros se observa un resumen en la figura 2.

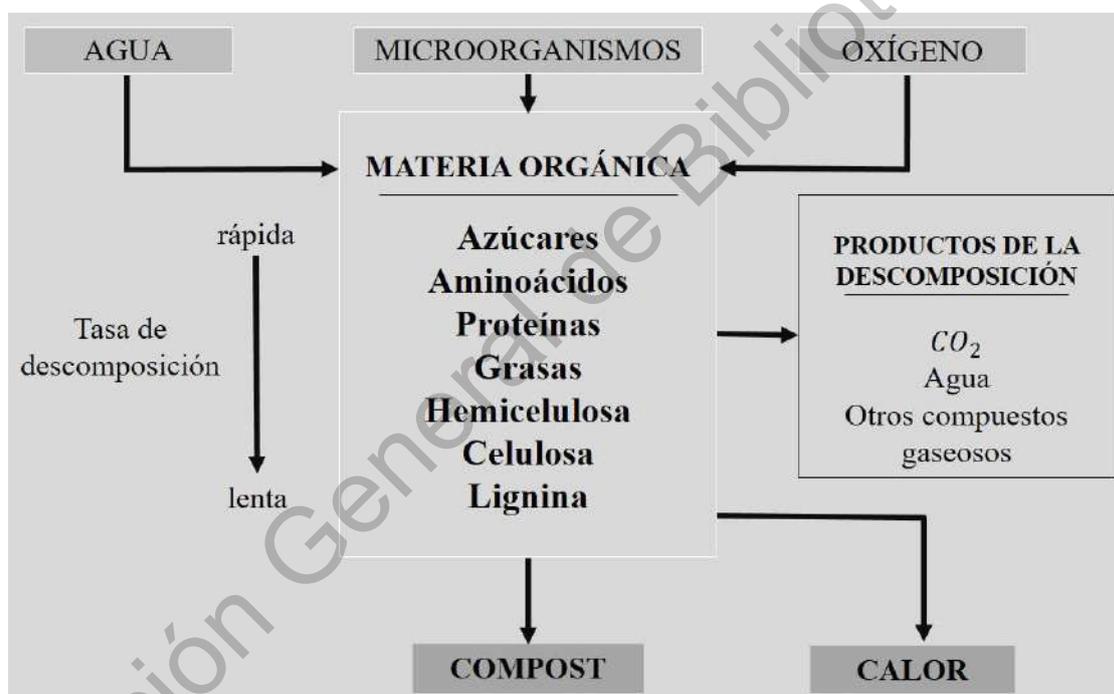


Figura 2. Esquema conceptual del proceso de compostaje.

2.3.1 Fase Mesófila.

El proceso de compostaje comienza a temperatura ambiente ($T < 45^{\circ}\text{C}$) en pocos días (2-8 días), los microorganismos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Thiobacillus* y *Enterobacter* (Fernández, 2005), inician la descomposición de las moléculas fácilmente degradables de Carbono (C) y Nitrógeno (N). Esta actividad genera energía que se libera en forma de calor (Barrena, 2007), con ello un incremento

paulatino de temperatura ($T=45^{\circ}\text{C}$), dando inicio a la siguiente etapa.

2.3.2 Fase Termófila o de Higienización.

Con el incremento de la temperatura y a medida que el proceso avanza y las condiciones varían, comienzan a aparecer microorganismos termófilos capaces de degradar proteínas, ácidos grasos y polisacáridos como celulosa y hemicelulosa (Fernández, 2005), moléculas estructurales de las plantas, el pH tiende a bajar (4 a 4.5), el material alcanza temperaturas de 45°C a 70°C . La biomasa de los microorganismos termófilos en su mayoría son bacterias de los generos *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Clostridium* entre otras, hongos del género, *Mucorpusillus*, *Torulathermophila*, *Thermoascusaurantiacus*, *Geotrichum*. que actúan sobre las fuentes más complejas de C (Romanet *al.*, 2015).

Esta etapa se destaca por un elevado consumo de oxígeno y donde el calor generado elimina patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* y hace inviables las semillas existentes en el sustrato con ello se asegura la higienización del producto final (Barrena, 2007).

2.3.3 Fase de Enfriamiento o Mesófila II.

Cuando las fuentes de carbono y nitrógeno se agotan en el material de compostaje, la temperatura tiende a disminuir hasta los $25-30^{\circ}\text{C}$ (Hernández, 2003). Continúa la degradación de polímeros (celulosa), aparecen *Aspergillus* y hongos visibles, los microorganismos mesófilos reinician su actividad y el pH asciende de (5 a 8).

2.3.4 Fase de Maduración.

En esta fase se mantienen los microorganismos de la fase anterior, se produce reacciones secundarias de condensación y polimerización de compuestos carbonatados que resulta en la formación de ácidos húmicos y fúlvicos (Pilar-Roman, 2013).

Los ácidos húmicos y fúlvicos son moléculas de bajo peso molecular, actúan sobre las propiedades físicas y químicas del suelo, mejoran la estructura del suelo, aumento en la capacidad de intercambio catiónico (Fertilab,2019).

La composta madura emite un olor agradable, temperatura baja, humedad del 10 al 20%, biológicamente inocua, libre de patógenos y contenido de nutrientes para los cultivos (Ayala, 2018).

2.4 Mineralización del Fósforo.

La Mineralización es el proceso de conversión de los nutrientes disponibles en los residuos orgánicos a la forma inorgánica o mineral para que de esta forma sean asimilables por la planta y ocurre principalmente por microorganismos y la acción enzimática. En el caso del P, la mineralización se lleva a cabo por Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (PSM por sus siglas en inglés), los PSM se dividen en Bacterias (PSB) y Hongos (PSA)(Khan *et al.*, 2009), estos microorganismos exudan enzimas fosfatasas y fitasas las cuales hidrolizan fosfomonoésteres (compuestos con un enlace de éster unido a ortofosfato) como lo son los fosfatos de inositol; fosfodiésteres (dos enlaces de éster al ortofosfato) tales como ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido lipoteicoico, ácidos grasos fosfolípidos y polifosfatos orgánicos como es el caso de trifosfato de adenosina.

La liberación del P insoluble e inmóvil (quelatado) en los sustratos es mediante la liberación de ácidos de bajo peso molecular por las PSB (Khan *et al.*, 2009).que están asociadas a los procesos con las formas de fosfatotricálcico $Ca_3(PO_4)_2$, fosfato de aluminio $AlPO_4$ o fosfato de hierro $FePO_4$.

2.5 Bacterias Solubilizadoras de Fósforo (PSB).

Las Bacterias solubilizadoras de fosfato pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Sharma *et al.*, 2011). Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato, asimilan el elemento y lo solubilizan.

Uno de los principales problemas de las PSB, son las condiciones una vez implementadas en la composta, debido a los niveles de pH, la textura y los microorganismos que se encuentren presentes.

2.6 *Pseudomonas aeruginosa* como Solubilizadora de Fosfato.

Se tiene evidencia de que algunas especies de *Pseudomonas* incrementan la absorción de nutrientes, como N, P y K, además de servir como biocontrol de hongos fitopatógenos y producir fitohormonas en la rizosfera, lo cual promueve mayor crecimiento de las plantas. En general, *P. fluorescens* puede promover el crecimiento de las plantas, vía producción de sideróforos extracelulares que secuestran óxidos férricos para convertirlos en formas disponibles para las raíces, además que incrementa el volumen radical (Strom, 1985). Dichas bacterias se concentran en el rizoplaneo y varían la proporción de acuerdo con los cultivos, por ejemplo, Vlassacket *al.* (1992), al inocular *P. fluorescens* en el rizoplaneo del plátano, encontraron 10.8% más población que en rizoplaneo de arroz (4.35%), en comparación con las plantas sin inocular, respectivamente. Los compuestos inorgánicos insolubles de fósforo como el fosfato de calcio ($Ca_3(PO_4)_2$) no están totalmente disponibles para las plantas, pero éstos pueden convertirse, por bacterias solubilizadoras de P, en fosfatos di y monobásicos, formas asimilables para las raíces de las plantas. Las principales especies activas en esta conversión pertenecen a los géneros: *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Flavobacterium* (Salih *et al.*, 1989).

Este microorganismo es ubicuo en el medio ambiente puede llegar a persistir de manera eficaz en el agua y en el suelo viviendo con un requerimiento

nutricional mínimo y tolerando diversos medios físicos. Puede crecer a temperaturas de entre 20°C y 43°C, y al crecer en altas temperaturas se diferencia del resto de las otras especies de *Pseudomonas*. Se caracteriza por tener la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoníaco, obteniendo energía de la oxidación de azúcares. La bacteria también tiene la capacidad para producir una serie de enzimas capaces de degradar múltiples proteínas.

2.7 Enzimas.

Las enzimas son moléculas de proteínas con la capacidad de acelerar las reacciones químicas con ellos disminuir la energía de activación de la reacción (Govindaraju, 2007), estas enzimas degradan sustratos orgánicos en moléculas de importancia una determinada velocidad, en un medio cuya composición, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica, pH, etc. son prácticamente constantes (Guija, 2013). degradan azúcares, sintetizan grasas y aminoácidos, copian la información genética, participan en el reconocimiento y transmisión de señales del exterior y se encargan de degradar subproductos tóxicos para la célula, entre muchas otras funciones vitales(Ramírez., 2014).

La investigación de la producción de enzimas de importancia en la agricultura, con el fin de solucionar un problema para la obtención de nutrientes como fitasas y fosfatasas, directamente relacionadas con la degradación de formas complejas de fósforo.

2.8 Enzimas Fitasas.

Las fitasas forman parte de un subgrupo de enzimas de la familia de las fosfatasas ácidas, las cuales son del tipo hidrolasas. Éstas actúan rompiendo los enlaces fosfomonoéster degradando los fitatos a mioinositolhexafosfato y fósforo inorgánico, los cuales tienen menor o nulo efecto quelante(Kim *et al.*, 2006). Las fuentes naturales de fitasas, incluyen algunas variedades de plantas, ciertos animales no rumiantes y determinados microorganismos como (*Aspergillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, levaduras, etc.). El ácido fítico es un ácido carboxílico, el cual posee en su estructura seis protones fuertemente acoplados lo que le

confiere una estructura fuerte de quelación sobre minerales esenciales (Ca, Mg y Fe) (Neira, 2013), así como la capacidad de unirse a proteínas, aminoácidos y azúcares (Rigon *et al.*, 2007).

2.9 Enzimas Fosfatasas.

Las fosfatasas catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídros de Ácido Fosfórico (H_3PO_4), responsables de la mineralización del fósforo orgánico del suelo, liberación de fósforo inorgánico. Se clasifican en fosfatasas ácidas, neutras y alcalinas (Yoshioka *et al.*, 2006).

Las fosfatasas ácidas son producidas por microorganismos y plantas, son ampliamente distribuidas en la naturaleza y tienen la propiedad de hidrolizar fosfomonoésteres a pH 5, liberando como productos de la reacción un alcohol y fosfato inorgánico (Guija, 2013). Diversos métodos de purificación han permitido obtener fosfatasas de múltiples fuentes, con un elevado grado de pureza.

2.10 Método de Interacción de Enzimas.

Las enzimas son un grupo variado y especializado dentro de las proteínas (Merino & Noriega, 2006) formadas por aminoácidos que catalizan reacciones químicas en los organismos. Un catalizador es un compuesto que con su presencia aumenta la velocidad de la reacción. Actividad que depende de su estructura tridimensional que va formando cavidades denominadas, sitio activo, las cuales muestran atracción por moléculas específicas llamados sustratos (Ayala, 2014). La combinación de grupos funcionales químicos presentes en estos sitios activos genera interacciones entre la proteína y los sustratos, teniendo como finalidad un producto.

En la época moderna el uso de enzimas para la transformación de macromoléculas complejas es una de las biotecnologías más relevantes.

2.11 Antecedentes actuales de trabajos de adición de enzimas y evaluaciones en Plantas.

Damon y colaboradores (2014), reportan transcritos de fitasas en estudios de metatranscriptómica en mantillo de bosques, atribuyendo la mineralización del Fósforo orgánico en dicho ecosistema y la disponibilidad del elemento, aunque se desconoce los mecanismos que le dan estabilidad a las fracciones de P. Sakurai (2008), encontró actividad de fosfatasa alcalina y diversidad de genes que codifican esta actividad en comunidades bacterianas de suelos agrícolas, utilizando técnicas de PCR cuantitativa, así como mayor contenido de fósforo microbiano y disponible con la adición de enmiendas orgánicas frente a una fertilización química; beneficiosas desde el punto de vista económico y ambiental para los sistemas agrícolas.

Wanner (1996) encontró enzimas que funcionan como eliminadores de fosfoésteres orgánicos, liberando fosfato inorgánico a partir de nucleótidos y fosfatos de azúcar; se observó que la actividad de la enzima fosfatasa en suelo y el contenido de P disponible aumentaron significativamente después de aplicar enzima fitasa exógena en macetas con *Malushalupehensis*.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis.

La adición de enzimas fosfatasas y fitasas en la mineralización de los residuos orgánicos incrementará el contenido de fósforo inorgánico en relación a los sistemas convencionales, debido a la acción catalizadora sobre el fósforo orgánico no disponible.

3.2 Objetivo General.

Evaluar la adición de enzimas fosfatasas y fitasas, obtenidas de una PSB (*Pseudomonas aeruginosa*) en composta madura para incrementar el contenido de P disponible para la Agricultura.

3.3 Objetivos Particulares.

- Analizar la actividad específica de fosfatasa y fitasa presentes en *Pseudomonas aeruginosa* cultivada en un medio estándar.
- Evaluar las diferentes estrategias del uso de un microorganismo solubilizador de Fósforo para aumentar la disponibilidad en composta madura.
- Adicionar una mezcla enzimática obtenida de diferentes medios de cultivo en composta madura para aumentar el P disponible.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Localización de área de estudio.

Se realizó el experimento en el laboratorio de Microbiología y Biología molecular del Campus Amazcala, extensión de la facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro

4.2 Evaluación de la actividad específica para la obtención de Fósforo disponible a partir de *Pseudomonas aeruginosa* en distintos medios de cultivo.

4.2.1 Cinética de la Turbidiometría de *Pseudomonas aeruginosa* de caldo de papa dextrosa.

En el Laboratorio de microbiología, se realizó la esterilización de los materiales utilizados en los experimentos y los distintos medios de cultivo. La bacteria PSB utilizada fue *Pseudomonas aeruginosa* ATC 15442 que se obtuvo del Instituto Politécnico Nacional, se inoculó en medio Luria Bertani (LB) para activar su metabolismo por 24 hrs. Se realizó una cinética durante 16 hrs para determinar la hora del cambio de la fase exponencial de la bacteria, mediante absorbancia en un espectrofotómetro a 360 nanómetros en el medio de PDB

4.2.2. Actividad específica y Unidades Formadoras de colonia (UFC) de *P. aeuroginosa* en medio de fitato de sodio y PDB

Se activó la bacteria en LB por 24 hrs, posteriormente se tomó una muestra al inicio de la fase exponencial, esta muestra se inoculo en medio de fitato de sodio (Rocky-salimiet *al.*, 2016) para analizarla producción de fitasas

En el medio de PDB se inoculo otra muestra de la PSB en fase exponencial para analizar la producción de fitasas, fosfatasas alcalinas, neutras y ácidas. En cada medio se cuantificó las unidades formadoras de colonia (UFC) mediante el método del número más probable (NMP).

4.2.2.1 Determinación de la unidad enzimática.

Todas las enzimas se cuantificaron por unidad enzimática. Para las enzimas, el sobrenadante se midió a 420 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis para determinar la concentración de P inorgánico. Con una curva estándar de p-nitrofenol se determinó la unidad enzimática (U) (Behera et al., 2017).

4.2.2.2 Determinación de la concentración de proteína.

Se seleccionó una alícuota de cada sobrenadante (1.5 ml) y se le analizó la cantidad de proteína por el método de Bradford (1976). Para esto se realizó una curva de calibración con una proteína estándar (Albúmina de suero bovino (BSA), en unión con un colorante azul de Coomassie G-250. La cuantificación se hizo midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS, a 595 nm, y se graficó la absorbancia y la concentración de proteínas, obteniendo así la curva de calibración.

Después de hacer la curva de calibración se preparó la solución de dilución que consiste en 4 ml de agua desionizada por 1ml de colorante azul de Coomassie G-250, se mezcló con el agitador vortex MX-S. De las muestras se tomó un volumen de 10 μ L y se completó a 200 μ L con la solución de dilución mencionada anteriormente. Se midió la absorbancia a 595 nm y se determinó la concentración de proteína

4.2.2.3 Obtención de actividades enzimáticas específicas.

Se calcularon las actividades específicas de las enzimas que se expresan como unidades (U) por mg de proteína (Yu *et al.*, 2012).

4.3 Análisis de diferentes estrategias del uso de *P. aeruginosa* para aumentar la disponibilidad de Fósforo en composta madura.

4.3.1 Preparación de prueba experimental.

Se activó el metabolismo de la *P. aeruginosa* PSB al inocularla en LB por 24 horas, pasado el tiempo se inoculó el 3% de bacteria en PDB, durante 9 horas a 200 rpm. Cada tratamiento se diluyó con agua isotónica para humedecer la muestra de 50 g. de composta madura en una relación 1:1 de volumen/ peso (v/w).

La composta madura se homogeneizó y se colocó extendida en platos de poliestireno expandido y aluminio en la segunda fase experimental, este método se repitió en cada tratamiento de adición.

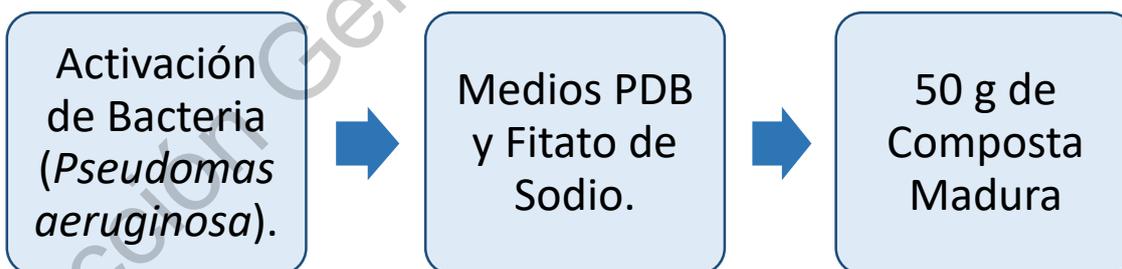


Figura 3. Preparación experimental para el incremento de P disponible en composta. Activación de la Bacteria en medio PDB para agregar a la muestra de composta madura.

4.3.2 Primer Experimento de adición de solubilización de fósforo en composta madura.

Se colocó 10% en una relación de volumen de tratamiento por peso de

composta madura (V/W). Todo se realizó por triplicado y la parte faltante de solución se agregó agua isotónica. Los tratamientos se describen en la Fig. 4. La prueba consistió en humedecer homogéneamente la composta (Figura 5) que se colocó en platos y después en vasos para mantener la humedad. De esta prueba se recolectaron muestras cada 24 horas hasta las 72 horas con el fin de obtener el tiempo de duración de la actividad solubilizadora de fósforo. Las muestras se enviaron al laboratorio de suelos del INIFAP para los análisis de P disponible (Olsen) y de P Total.

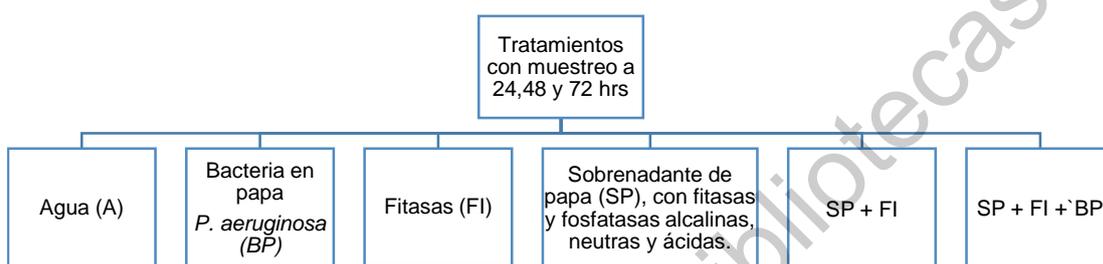


Figura 4. Diseño factorial incompleta de adición de tratamientos en solubilización de P disponible en composta.



Figura 5. Aplicación de los tratamientos humedeciendo homogéneamente la composta (50 gr).

4.4 Adición de una mezcla enzimática con incrementos de porcentaje cada 20% en relación volumen (sobrenadante) y peso (composta madura) para aumentar el Fósforo disponible.

En esta prueba se aumentó el porcentaje del mejor tratamiento que fue el sobrenadante de papa y los porcentajes se aumentaron en 20%, 40%, 60% 80% y 100%, donde el faltante se adiciono agua isotónica. La mezcla enzimática del sobrenadante se desnaturizó mediante temperatura a 90°C por 25 min con los mismos porcentajes. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los análisis se enviaron al laboratorio de suelos del INIFAP para P Olsen y P Total.

4.5 Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos fueron ANOVA y prueba de Tukey en 95% se realizaron en programa Minitab19.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

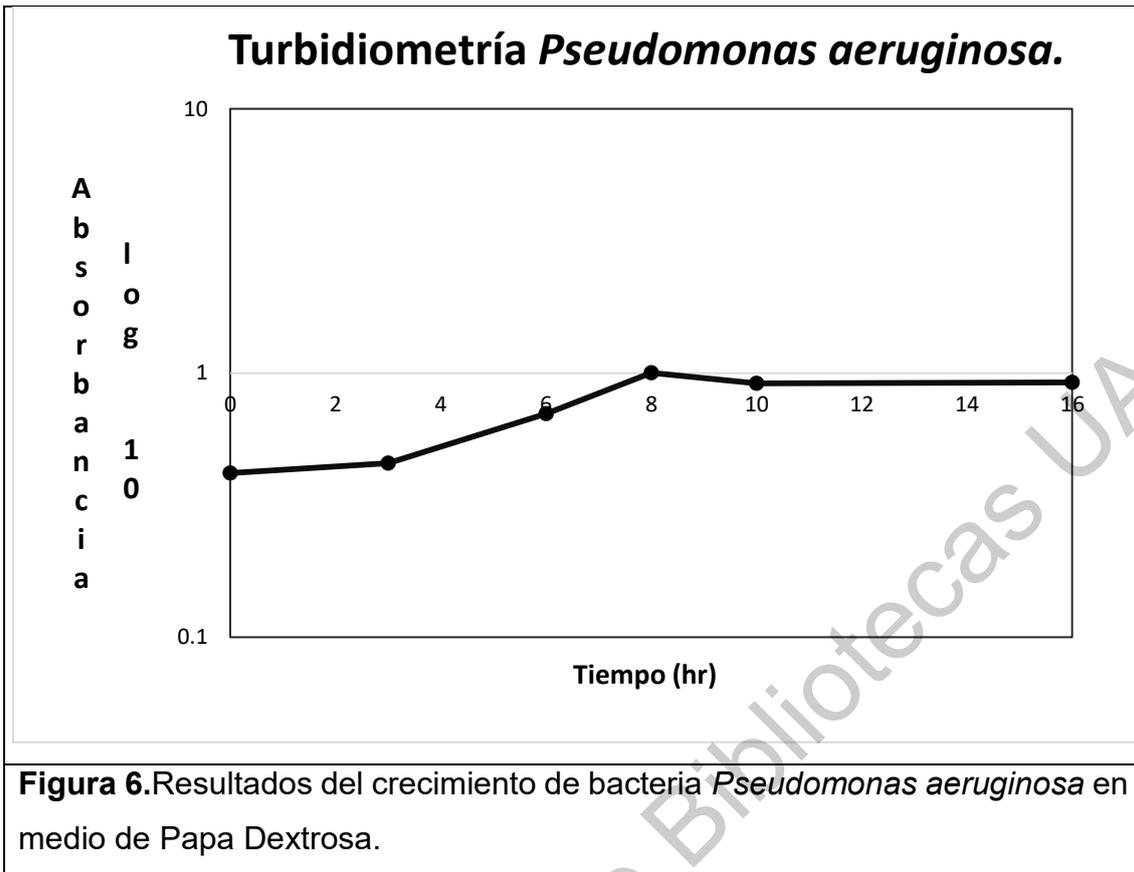
La obtención de P disponible para la agricultura mediante enzimas fosfatasas y fitasas aisladas de una PSB (*Pseudomonas aeruginosa*), que se adicionaron en composta madura representa una opción viable para disminuir costos de producción y la disminución de la dependencia de fertilizantes exportados.

5.1 Evaluación de la actividad específica para la obtención de Fósforo disponible a partir de *Pseudomonas aeruginosa* en distintos medios de cultivo.

En este apartado se va a mostrar los resultados de una serie de experimentos concatenados que van desde el experimento de una cinética por medida en espectrofotometría hasta la inoculación de medios selectivos de fuente de fosforo orgánico, donde se presenta la liberación de las enzimas solubilizadoras de fosforo.

5.1.1 Resultado de la turbidimetría de *Pseudomonas aeruginosa* en caldo de papa dextrosa.

Los resultados del crecimiento de la PSB (*Pseudomonas aeruginosa*) en PDB mediante turbidimetría se observan en la fig (6) y se obtuvo que el lapso de tiempo del cambio de la fase exponencial que es la de mayor actividad metabólica fue alas horas 8 y 9, con absorbancias respectivas de 0.712 y 0.879, a partir de este se evidencio la fase estacionaría de la bacteria hasta las.16 hrs.



De acuerdo con (Schulzet *al.*, 1988) se ha demostrado que el método turbidimétrico tiene potencial para ser un método rápido y exacto para la enumeración indirecta de microorganismos teniendo la desventaja de requiere una laboriosa ingeniería para pre-cuantificar en medios las concentraciones de bacteria de los diferente medios de cultivo.

Con esta referencia en esta tesis se utilizó la turbidimetría para tener una aproximación de los cambios en la población bacteriana determinados por la absorbancia para en el siguiente experimento obtener el conteo de las colonias bacterianas.

5.1.2. Actividad específica y Unidades Formadoras de colonia (UFC) de *P. aeruginosa* en medio de fitato de sodio y caldo de papa dextrosa

La bacteria *P. aeruginosa* solubilizadora de fosforo en el medio mínimo de fitato de sodio presento de acuerdo al método NMP se obtuvo 1×10^7 UFC/g y el promedio de la actividad específica de las fitasas fue 0.113 U/mg proteína.

La *P. aeruginosa* en el medio de PDB presento 1×10^8 UFC/g y la actividad específica a las horas 8 y 9 de crecimiento se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Resultados de la actividad específica en PDB de la PSB *P. aeruginosa*.

Enzimas (U/mg proteína)	8 horas	9 horas
Fosfatasa ácida	0.184	0.247
Fosfatasa neutra	0.102	0.185
Fosfatasa alcalina	0.220	0.230
Fitasa	0.005	0.005

Los resultados obtenidos en fitasas donde la mayor concentración fue en el medio de fitato de sodio con 0.113 U/mg proteína obtenida bajo estas condiciones experimentales se encuentra por debajo a lo reportado por Sasirekha *et al* (2012) en *P. aeruginosa*P6 con una cantidad de 31.88 U/mg proteína pero esto fue reportado para enzima pura.

Este trabajo basado en el estado del arte es el primer reporte de la presencia enzimática de fosfatasa acida, alcalina, neutra y fitasa exudadas por la bacteria *P. aeruginosa* en un mismo medio de cultivo (PDB) para mineralizar P orgánico (Rocky-Salimi *et al*, 2016; Behera *et al.*, 2017; Safari *et al.*, 2020).

5.2 Resultados de Primer Experimento de adición de solubilización de fósforo en composta madura.

Los tratamientos que obtuvieron mayor liberación de P Olsen disponible para las plantas derivado del P orgánico contenido en la composta madura producida en el campus Amazcala se presentan sus promedios y grupos estadísticos en la siguiente tabla:

Tabla 2. Promedios de los tratamientos con mayor liberación de P Olsen de la composta madura.

Tratamientos	Promedio P Olsen (%)	Grupo estadístico
SP-24	8.610	a
SP-48	8.319	ab
SP-72	8.230	ab

SP+FI-24	7.855	abc
----------	-------	-----

Nota: Las letras (a,b,c) diferentes significan diferencia estadística e iguales similitud.

La comparación de los diferentes tratamientos que consistieron en adicionar la PSB, y las enzimas de cada medio de cultivo como sus combinaciones se muestran en la figura 7, sabiendo que los mejores resultados se encontraron en el sobrenadante de papa que representa el contenido de la mezcla de enzimas solubilizadoras de fósforo.

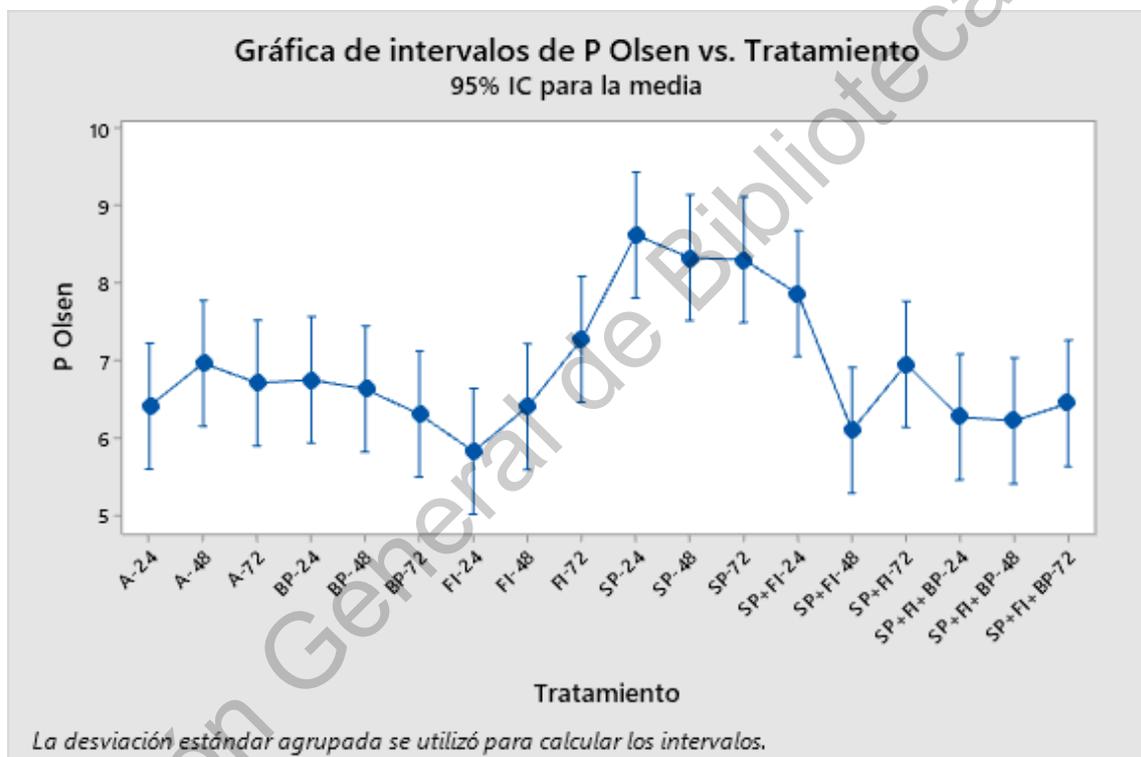


Figura 7. Resultados del análisis estadístico de tratamientos a las 24, 48 y 72 horas de aplicación.

Agua Isotónica (A), Bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*), medio de papa dextrosa (BP), fitasas (FI), sobrenadante de papa (SP), (SP+FI), y (SP+FI+BP).

Se evaluó estadísticamente si existía diferencia en los periodos de tiempo de cada 24 horas de aplicación de los tratamientos, no resultando una diferencia significativa en el análisis estadístico por lo que se tomó la hora con el mayor

promedio de liberación siendo el tratamiento SP-24 y además con la factibilidad que disminuye el periodo de tiempo de aplicación.

Los resultados descritos en las referencias se basan en la inoculación de PSB en composta madura o en la adición de fertilizantes fosforados solos o en conjunto con PSB (Wei *et al.*, 2018; Zhu *et al.* 2018). Esto es para incrementar el P disponible donde no buscamos adicionar fertilizante si no encontrar una fuente reciclable de P disponible de la composta con las PSB.

Nuestros resultados mostraron que el uso de enzimas para solubilizar el fósforo aumenta el P disponible en comparación con la inoculación de PSB. Estos resultados están de acuerdo con *Bacillus sp.* MQH-19 que produce fitasas y obtuvo un aumento de 8%-13% en P disponible para estiércol de ganado (Zhao *et al.*, 2016).

5.3 Resultado de la adición del incremento del porcentaje de la mezcla enzimática cada 20% al 100% en composta madura para aumentar el Fósforo disponible.

Los resultados de la aplicación de mezclas enzimáticas muestran que la SP-40 es la que resulto en la mayor liberación del P Olsen en comparación con los demás tratamientos enzimáticos teniendo una diferencia del 20% a favor ; en comparación con el control de agua se obtuvo un incremento del 60% de liberación de P Olsen, (fig. 8). Esto en comparación con el P total presente en la composta madura representa que SP-40 solo mineralizó el 15% quedando todavía el 85% de P orgánico en la composta, lo cual representa una futura perspectiva.

Los tratamiento de PD (20,40,60,80 y 100), se mantuvieron con una concentración de P Olsen iguales, que fue de 20% más que A, lo que nos indica que se pudo liberar P disponible al calentar el medio PDB para desnaturalizar la enzima. Cabe señalar que fue una liberación significativa con el control pero baja estadísticamente con el mejor tratamiento SP-40 (Ortega-Torres *et al.*, Unpublished).

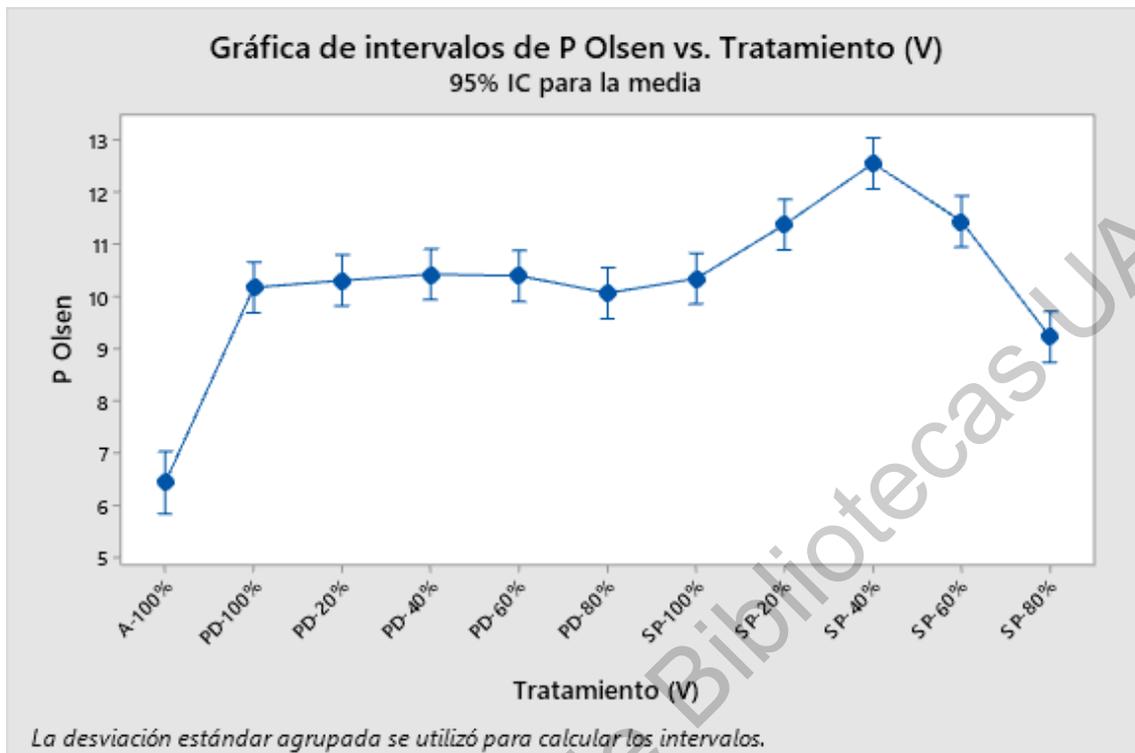


Figura 8. Resultados de análisis estadístico de tratamientos con concentración mayor al 20%.

VI. CONCLUSIONES.

La bacteria solubilizadora de Fósforo *P. aeruginosa* ATC 15442 en la presente tesis demostró que puede un microorganismo exudar una serie de enzimas que sean de interés industrial un medio de cultivo general diferente al medio mínimo que se utiliza comúnmente en la literatura para el caso de las fosfatas y fitasas. Se obtuvo el aumento del 60% de mineralización de P disponible para la agricultura para la mezcla de enzimas presentes en el caldo de papa dextrosa, lo que puede permitir escalar la producción.

Este es el primer trabajo en su tipo de la adición de la mezcla enzimática en composta madura para incrementar el P disponible y con un resultado significativo así como de la presencia de la mezcla de enzimas en un medio de cultivo. Este trabajo permite utilizar la bacteria como solubilizadora, utilizar de forma in vitro las enzimas y abre una posibilidad para que el porcentaje que queda de la composta de P orgánico puede incrementarse por diferentes

estrategias del uso de PSMS y estos en apoyar la fuentes renovables de P para los países que no cuentan con una reserva de P.

VII. RECOMENDACIONES Y FUTURAS INVESTIGACIONES.

Este trabajo es una propuesta para aumentar la disponibilidad de P para la agricultura en los países que importan fertilizantes fosforados, esta disponibilidad sabemos se encuentra presente en las compostas que es un gran nicho de P orgánico, el cual se puede explotar en mayor escala con el uso de enzimas aisladas de microorganismos y con birreactores de cultivo de microorganismos en que puedan ser escalables.

La futura investigación es ver cómo está el ciclo de P en el compostaje para comprender como se puede aumentar su disponibilidad y porque estrategia microbiológica o fisicoquímica puede ocurrir este resultado.

VIII. - REFERENCIAS.

- Arun. (2017). Study on optimization of process parameters for enhancing the multi-hydrolytic enzyme activity in garbage enzyme produced from preconsumer organic waste. *Bioresource Technology*, 226, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.029>
- Ayala. (2018). Facultad de ciencias ambientales carrera profesional de ingeniería ambiental. Universidad Científica Del Sur. Facultad de Ciencias Ambientales. *Ingeniería Ambiental.*, 1–126. Retrieved from <http://repositorio.cientifica.edu.pe:8080/handle/UCS/710>
- Barbieri, P. A., Echeverría, H. E., & Saínez Rozas, H. R. (2018). Métodos de colocación de fosforo en trigo y maíz bajo siembra directa en el sudeste bonaerense. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 44(3), 301–308.
- Barrena Gómez, R. (2007). *Compostaje de residuos sólidos orgánicos aplicación de técnicas respirométricas en el seguimiento del proceso*. Universitat Autònoma de Barcelona,.
- Barrow, N. J. (2017). The effects of pH on phosphate uptake from the soil. *Plant and Soil*, 410(1–2), 401–410. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3008-9>
- Behera, B. C., Yadav, H., Singh, S. K., Mishra, R. R., Sethi, B. K., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase

- activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.003>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Behera BC, Yadav H, Singh SK et al (2017) Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp . isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta , Odisha , India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15:169–178.
- CCA. (2017). Caracterización y gestión de los residuos orgánicos en América del Norte. In *Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal*. (p. 52).
- Cronje, A., Turner, C., Williams, A., Barker, A., & Guy, S. (2003). Composting under controlled conditions. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 24(10), 1221–1234. <https://doi.org/10.1080/09593330309385664>
- Damon, P.M., Bowden, B., Rose, T., Rengel, Z., 2014. Crop residue contributions to phosphorus pools in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* 74, 127–137
- Feng, C., Zeng, G., Huang, D., Hu, S., Zhao, M., Lai, C., ... Li, N. (2011). Effect of ligninolytic enzymes on lignin degradation and carbon utilization during lignocellulosic waste composting. *Process Biochemistry*, 46(7), 1515–1520. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.038>
- Fernández A. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia Del Suelo*, 23(1), 31–37.
- FERTILAB. (25 de 11 de 2017). NOTAS TECNICAS. Obtenido de <https://www.fertilab.com.mx/blog/247-funciones-de-las-sustancias-humicas-acidos-fulvicos/>.
- Frossard, E., Achat, D. L., Bernasconi, S. M., Fardeau, J., Jansa, J., Morel, C., ... Oberson, A. (2011). *The Use of Tracers to Investigate Phosphate Cycling in Soil – Plant Systems*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9>
- García-oliva, Y. T. F. (2013a). *LA DISPONIBILIDAD DEL FÓSFORO ES PRODUCTO DE LA ACTIVIDAD BACTERIANA EN EL SUELO EN ECOSISTEMAS OLIGOTRÓFICOS : UNA REVISIÓN CRÍTICA*
Phosphorus Availability is a Product of Soil Bacterial Activity in Oligotrophic

Ecosystems :

- García-oliva, Y. T. F. (2013b). La Disponibilidad Del Fósforo Es Producto De La Actividad Bacteriana En El Suelo En Ecosistemas Oligotróficos: Una Revisión Crítica. *Terra Latinoamericana*, 31(3), 231–242.
- Govindaraju, et al. (2007). Seguimiento del proceso de humificación en compost inoculado. *Procedia Manufacturing*, 30(22 Jan), 588–595.
- Guadarrma Nonato, A., Mejía-Carranza, J., & Ramírez-Gerardo, M. G. (2018). Mineralización de la materia orgánica en suelos con manejo diferencial en cultivo de rosa. *Acta Universitaria*. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1654>
- Guija E. (2013). Mecanismo de acción de las fosfatasas ácidas de bajo peso molecular. *Anales de La Facultad de Medicina*, 68(4), 356. <https://doi.org/10.15381/anales.v68i4.1203>
- Guijarro, H. (2018). Bacterias nativas del suelo con potencial para la degradación de glifosato y promoción del crecimiento vegetal. *Ciencia Del Suelo*, 17(2), 21–27.
- Hernández A. (2003). La Composta , su Elaboración y Beneficio. *Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*.
- Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., & Rasheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 1(1), 48–58. <https://doi.org/10.5923/j.re.20120201.10>
- Kim. (2013). Aspectos fundamentales de las fitasas Fundamentals of phytases. *Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 21(57), 58–63.
- López-Aizpun, M; Arango-Mora, C; Santamaría, C.; Lasheras, E; Santamaría, J.M.; Ciganda, V. S.; Cárdenas, L.M.; Elustondo, D; 2018; Atmospheric ammonia concentration modulates soil enzyme and microbial activity in an oak forest affecting soil microbial biomass; *Soil Biology and Biochemistry*; 116: 378-387.
- Lougheed, T. (2011). La paradoja del fósforo. In *Perspectives, Environmental Health* (Vol. 53, pp. 449–455).
- Merino, J., & Noriega, M. J. (2006). Fisiología General Enzimas. *Fisiología General: Enzimas*, 1–13.
- Monsalve Ó. (2017). Factores que intervienen en el proceso de mineralización

de nitrógeno cuando son aplicadas enmiendas orgánicas al suelo . Una revisión Factors involved in the process of nitrogen mineralization when organic amendments are added to a soil . A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas.*, 11(1), 200–209.

Neira A. (2013). Fundamentals of phytases. *Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes.*, 21(57), 58–63.

Ramírez J. (2014). Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? *Revista Digital Universitaria*, 15(12), 1–13.

Rincón, L. E. C., & Gutiérrez, F. A. A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285-295.

Rittmann, B. E., Mayer, B., Westerhoff, P., & Edwards, M. (2011). Capturing the lost phosphorus. *Chemosphere*, 84(6), 846–853.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.001>

Rocky-salimi, K., Hashemi, M., & Safari, M. (2016). A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* B . S . 46. *Journal of Advanced Research*, 7(3), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.02.003>

Román, P., Martínez, M. M., & Pantoja, A. (2013). *Manual de compostaje del agricultorexperiencias en américa latina*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Román, Pilar; Martínez María M.;Pantoja, A. (2015). *Manual de compostaje del agricultor*. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe.

Salih, H.M., Yahya, A.I., Abdul-Rahem, A.M., Munam, B.H., 1989. Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. *Plant Soil* 120, 181–185

Safari M, Motamedi E, Kari H et al (2020) Heliyon Nano-carriers effects on the viability and efficiency of *Pseudomonas* strains as phosphate solubilizing bacteria. *Heliyon*6:e05076. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05076>

Sasirekha B, Bedashree T, Champa K (2012) Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. *Eur J Exp Biol* 2:95–104.

Schulz, E., Jensen, B., & Celerynova, E. (1988). Automated turbidimetry for rapid determination of the bacteriological quality of raw meat and

- processed meat products, 6, 219–227.
- Sharma, S., Kumar, V., & Tripathi, R. B. (2011). Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars Research Library J. Microbiol. Biotech. Res*, 1(2), 90–95.
- Strom, P. F. (1985). Identification of Thermophilic Bacteria in Solid-Waste Composting, 50(4), 906–913.
- Tang, H., Zheng, Y., & Chen, Y. (2017). Materials chemistry of nanoultrasonic biomedicine. *Advanced Materials*, 29(10), 1604105.
- Vlassak, K., Van Holm, L., Duchateau, L., Vanderleyden, J., & De Mot, R. (1992). Isolation and characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with the roots of rice and banana grown in Sri Lanka. *Plant and Soil*, 145(1), 51–63.
- Wanner, B.L., 1996. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia coli and Salmonella*. 41, pp. 1357–1381
- Wei, Y., Zhao, Y., Shi, M., Cao, Z., Lu, Q., Yang, T., ... Wei, Z. (2018). Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*, 247, 190–199. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.09.092>
- Yoshioka. (2006). Actividad de fosfatasa ácida y alcalina en suelo cultivado con plátano en tres sistemas de manejo Actividad de fosfatasa ácida y alcalina en suelo cultivado con plátano en tres sistemas de manejo. *Acta Agronómica*, 55(2), 1–8.
- Yu X, Liu X, Zhu TH et al (2012) Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *Eur. J. Soil Biol.* 50:112–117. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.01.00>
- Zhao X; He X; Xi B et al (2016) The evolution of water extractable organic matter and its association with microbial community dynamics during municipal solid waste composting. *Waste Management* 56:79-87.
- Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of the Total Environment*, 612, 522–537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>

Dirección General de Bibliotecas UAQ