



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Campus Amazcala



**Análisis de máxima actividad de fosfatasas y fitasas de una bacteria
seleccionada por su capacidad solubilizadora de Fósforo**

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

Ingeniero Agroindustrial

Presenta:

Beatriz González Arjas

Dirigido por:

M. en C. Adrián E. Ortega Torres

M. EN. C. Adrián E. Ortega Torres
Presidente

Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Secretario

Firma

Dr. Enrique Rico García
Vocal

Firma

M. EN. C. Arturo Arana Juaristi
Suplente

Firma

RESUMEN

Debido al creciente aumento poblacional que demanda cada vez más y más alimentos, está razón hace la necesidad de buscar alternativas eficientes y amigables con el medio ambiente. La agricultura es la base de la alimentación y requiere de nutrientes para su desarrollo, entre los que se encuentra el fósforo, segundo elemento utilizado por la agricultura. El fósforo se debe adicionar para fertilizar las plantas, que se desarrolla principalmente por s fertilizantes fosforados que se producen de la extracción de depósitos de rocas fosfóricas que han ido disminuyendo hasta una posible escasez en los próximos años; otra fuente de fósforo está en su forma orgánica el cual no es disponible para la planta solo mediante el proceso de mineralización a su forma inorgánica disponible, esto se realiza por medio de las enzimas fosfatasas y fitasas extracelulares presentes en las bacterias solubilizadoras de fosfato. En el estudio se seleccionó una bacteria solubilizadora de fosfato por su mayor crecimiento en determinado tiempo, para analizar su actividad enzimática en diferentes medios selectivos de fósforo orgánico. La bacteria seleccionada fue *Bacillus pumilus* con la cual se realizó una cinética a varias agitaciones (0, 100, 200 rpm). Se obtuvo la unidad de actividad enzimática de las fosfatasas neutras, básicas y acidas, presentando que su mayor unidad enzimática es a las 200 rpm y en las fitasas su punto máximo lo alcanzaron a las 100 rpm. Se encontró que la bacteria *Bacillus pumilus* tiene todas las enzimas solubilizadoras de fosfato por lo cual tiene un potencial de uso en la agricultura o en sustratos con presencia de fósforo orgánico y con el trabajo se determinó la cantidad de conversión del fósforo orgánico en fosfatos lo que fue la unidad de actividad enzimática.

Palabras clave: enzimas, fosfato, bacterias-solubilizadoras-de-fósforo, *in-vitro*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ABSTRACT

Due to the growing population increase and the demand for food is increasing, which is why the need to find new efficient and environmentally friendly alternatives is born. Agriculture is the basis of food and requires nutrients for its development, among which is the phosphorus that is the second element used and necessary. Phosphorus must be added to fertilize plants, phosphorus fertilizers are produced from the extraction of deposits of phosphoric rocks that have been declining to a possible shortage in the coming years; Another source of phosphorus is its organic form which is not available to the plant only by the mineralization process to its inorganic form, this is done by means of the extracellular phosphatase and phytase enzymes present in phosphate solubilizing bacteria. In the study, a phosphate solubilizing bacterium was selected for its greater growth in a certain time, to analyze its enzymatic activity in different selective means of organic phosphorus. The bacterium selected was *Bacillus pumilus* with which a kinetics was made varying the stirring revolutions (0, 100, 200 rpm), where the unit of enzymatic activity was obtained with neutral, basic and acid phosphatases that presented their greatest enzymatic unit at 200 rpm and in the phytases their maximum point reached it at 100 rpm. We found that the bacterium *Bacillus pumilus* has all phosphate solubilizing enzymes and therefore has a potential for use in agriculture or in substrates with the presence of organic phosphorus and given the work the amount of conversion of organic phosphorus into phosphates was determined, which was the unit of enzymatic activity.

Key words: enzymes, phosphate, bacteria-solubilizing-phosphorus, *in-vitro*.

DEDICATORIAS

A mis padres Leonila y Salvador por siempre brindarme lo mejor de ellos mismos,
por creer en mí y enseñarme que todo es posible.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres por motivarme a seguir estudiando, por no dejar que me rindiera y por siempre apoyarme.

A mi director de tesis Adrián por apoyarme y ayudarme en todo el proceso, por ser una guía para mí, por los consejos escolares y personales.

A mi familia, mis hermanos y sobrinos por ser mi motor y siempre estar a mi lado.

A mi aijada Camila por todo el amor que me brinda y la motivación que me da.

A mis maestros por el conocimiento y apoyo brindado durante mi trayectoria.

A mis amigos Esbeidy y Joel por su valiosa amistad y por los grandes momentos y experiencias compartidas.

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	4
DEDICATORIAS	5
AGRADECIMIENTOS	6
I. INTRODUCCION.....	10
II. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES.....	12
2.1. Fósforo en el suelo.....	12
2.2 Ciclo del Fósforo.....	13
2.3 Fósforo Orgánico.....	14
2.3.1 Mineralización.....	15
2.3.2 Microorganismos Benéficos en la Composta.....	16
2.4 Microorganismos Solubilizadores de Fosfato.....	16
2.4.1 Fosfatasas.....	18
2.4.2 Fitasas.....	20
2.4.3 Producción de ácidos orgánicos.....	21
2.4.4 Inmovilización.....	22
2.5 Aspectos generales de <i>Bacillus</i> sp.....	22
2.6 Medios de cultivo y requerimientos.....	24
2.7 Métodos para determinar la solubilización de fosfatos.....	25
2.7.1 Método colorimétrico.....	25
2.7.2 Método p-nitrofenil fosfato.....	26
III. OBJETIVOS E HIPOTESIS	28
3.1 Hipótesis.....	28
3.2 Objetivo General	28
3.3 Objetivos específicos	28

IV. METODOLOGÍA	29
4.1 Ubicación del experimento.	29
4.2 Determinación de la actividad enzimática tipo fosfatasas y fitasas en el aislado de <i>B. pumilus</i>	29
4.2.1 Preparación de Medios selectivos	29
4.2.1.1 Fosfatasas	29
4.2.1.2 Fitasas	30
4.2.2 Inoculación de <i>Bacillus pumilis</i> en los medios selectivos	30
4.3 Optimización de la actividad enzimática tipo fosfatasas y fitasas in vitro para <i>Bacillus pumilus</i> aislado de composta.	31
4.3.1 Cinética con <i>Bacillus pumilus</i> , variando las condiciones de agitación y las fuentes de fósforo orgánico.	31
4.3.2 Obtención de la concentración de proteína por el método de Bradford de las alícuotas enzimáticas de la cinética.	32
4.3.3 Evaluación de la máxima unidad de actividad específica enzimática de la <i>Bacillus pumilus</i>	32
4.4 Diseño experimental.....	32
4.4.1 Análisis estadístico	33
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1 Determinación de la actividad enzimática tipo fosfatasas y fitasas en el aislado de <i>B. pumilus</i>	34
5.2 Optimización de la actividad enzimática tipo fosfatasas y fitasas in vitro para <i>Bacillus pumilus</i> aislado de composta.	36
5.2.1 Resultados de la cinética enzimática.....	36
5.2.2 Resultados de la concentración de proteína.....	40
5.3 Evaluación de la máxima unidad de actividad específica enzimática de la <i>Bacillus pumilus</i>	41

VI. CONCLUSIONES	43
VII. REFERENCIAS	44

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. INTRODUCCION

Una de cada nueve personas en el mundo padece hambre y esto tiende a un incremento, en el 2017 fueron 821 millones de personas subalimentadas (FAO, 2018). Por tales razones existe la necesidad de cubrir la demanda de alimentos en el mundo, a través de un manejo sostenible en la agricultura aprovechando los recursos suministrados los cuales pueden ser; fertilizantes, agua y suelo (Alori *et al.*, 2017). El fósforo (P) es el segundo nutriente primario que necesita la planta, es utilizado desde la división celular hasta la regulación de la vías metabólicas y los procesos de crecimiento (Satyaprakash *et al.*, 2017).

La forma de P que es disponible para las plantas es el fosfato, el cual en el suelo sólo se encuentra entre un 1 a 5% (Panda *et al.*, 2016). Los agricultores para solventar la falta de P utilizan fertilizantes químicos con fosfato que se incorporan a las plantas. Del total de la aplicación del fertilizante su disponibilidad es limitada debido a que se transforman en formas insoluble quedando disponible cerca del 5% de P para la planta (Pande *et al.*, 2017). Para poder obtener fertilizantes fosforados se requiere de la extracción de rocas fosfóricas de las cuales sus mayores depósitos se encuentran en Marruecos, China y EUA lo que implica que el resto del mundo depende de la importación del fertilizante, esto obliga a que la seguridad alimentaria este ligada a estos países (Dhillon *et al.*, 2017). Una cantidad de fósforo se encuentra en el suelo, en el agua y en los residuos orgánicos en forma orgánica lo cual lo hace insoluble para las plantas. Por lo cual, una nueva tendencia agrícola que es a base de microorganismos que permiten la obtención de nutrientes para el desarrollo del cultivo (Yacumal, 2015), son una opción para obtener el fósforo orgánico y hacerlo disponible para la planta, estos microorganismos se les llama solubilizadores de fósforo (MSP por sus siglas en inglés)

tienen la capacidad de convertir los compuestos orgánicos y quelatados de fósforo a P soluble y ser equilibrados con el medio ambiente (Young *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2016).

En este trabajo se evaluará una bacteria capaz de solubilizar el fósforo mediante su cultivo *in vitro* con el uso de medios selectivos de P orgánico permitan la presencia de las enzimas fosfatasas y fitasas para transformación a fósforo disponible soluble para la planta; una vez que se tenga la presencia de las enzimas se determinará su actividad específica que indicará la cantidad de moles de P orgánico que catalizará a P disponible, con este resultado la bacteria se puede cultivar en biorreactores para inocularla en fuentes de P orgánico.

II. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES

2.1. Fósforo en el suelo.

El fósforo (P), es uno de los elementos principales para el crecimiento de las plantas después del nitrógeno (Alori *et al.*, 2017). Constituye los fosfolípidos de las membranas celulares y del material genético; cumple funciones en el metabolismo energético celular y en procesos de fotosíntesis, glucólisis, respiración y síntesis de ácidos grasos (Dissanayaka *et al.*, 2018).

La mayoría de los suelos agrícolas contienen grandes cantidades de P orgánico e inorgánico, es inmóvil y en gran parte no está disponible para las plantas (Rezakhani *et al.*, 2019). En la agricultura se recurre a la aplicación de fertilizantes fosforados entre un 70% a 80% (Mitchell & Soga, 2005), que en sí mismos se combinan rápidamente con los iones de aluminio, hierro, calcio, magnesio y otros en los suelos para formar fosfatos insolubles (Ponmurugan & Gopi, 2006). Por lo tanto, la eficiencia de los fertilizantes con P rara vez supera el 30%, lo que deja tan solo un 10-20% disponible para la planta (Zhu *et al.*, 2018).

La fuente natural de los fertilizantes fosforados es la roca fosfórica (RP por sus siglas en inglés), que se encuentra en depósitos distribuidos de manera desigual en todo el mundo, concentrándose principalmente en China, Marruecos, Rusia, Túnez, Brasil, Jordania y EE.UU (Vaccari, 2011). Los depósitos de rocas fosfóricas tienen una nula recuperación, lo que hace a este elemento como no renovable para la producción de fertilizante y esto denomina al P como un ciclo biogeoquímico semi-abierto (Filippelli, 2011).

Por otra parte, la materia orgánica es un importante reservorio de P en un rango de 20–80% presente en suelos y del cual sólo el

0,1% del P total existe en una forma disponible para la absorción de la planta (Romanyà *et al.*, 2017).

2.2 Ciclo del Fósforo.

El ciclo del fósforo es un complejo sistema que involucra la acumulación de este en la biomasa microbiana, materia orgánica y formas inorgánicas. El fósforo se encuentra en el suelo formando parte de diferentes minerales como la fosforita, la apatita y en compuestos orgánicos. La mayor parte del P está en formas de minerales primarios fosfatados, humus, fosfatos insolubles de Ca, Fe y Al, y fosfatos fijados por los óxidos y minerales silicatados (Withers *et al.*, 2015).

Como se observa en la Figura 2.1, el fertilizante principal está constituido por rocas fosfóricas. El ciclo comienza con los iones de fosfatos disueltos, que las plantas lo pueden absorber y distribuir en todas las células. A su vez, los animales lo adquieren al ingerir los vegetales. Y al morir las plantas y los animales, como sus residuos liberan el P orgánico y las bacterias que lo solubilizan lo transforman a fosfato (Cerón & Aristizabal, 2012).

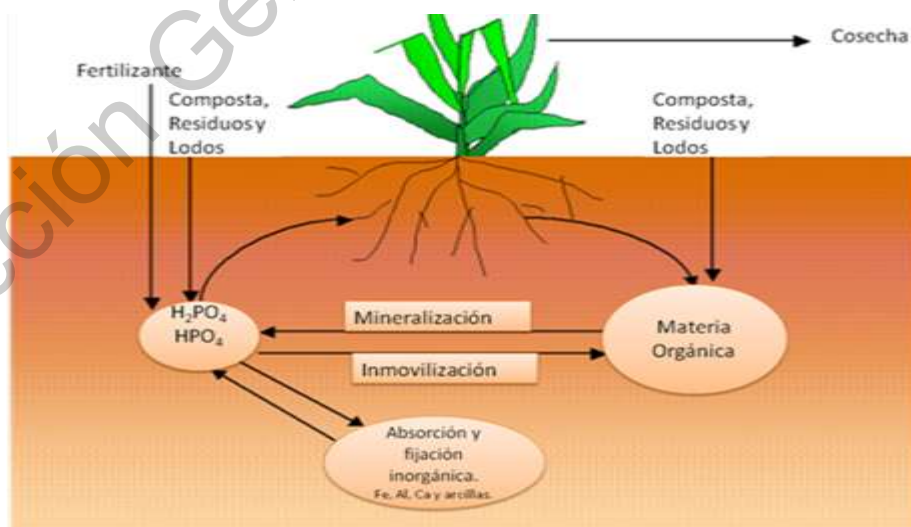


Figura2.1. Ciclo agrícola del Fósforo (Cerón y Aristizabal, 2012).

El P en el suelo es complejo porque se une con Ca, Fe y Al para formar fosfatos no solubles (Alcántara, 2009); debido a estas reacciones e inmobilizaciones cerca del 98% de los cultivos tienen un inadecuado suplemento de P, teniendo repercusiones en el rendimiento (Awasthi *et al.*, 2011). Esta condición obliga al uso inadecuado de fertilizantes fosforados que implica varios problemas: a) altos costos energéticos y económicos, b) muy baja eficiencia (5-30%), c) acumulación crónica de fosfatos en el ambiente, y d) escasez global de roca fosfórica, insumo esencial para la producción de fertilizantes fosfóricos (Cisneros *et al.*, 2017).

En estas condiciones, la utilización biotecnológica de microorganismos con capacidad para solubilizar la presencia del P en el suelo merece especial atención por sus múltiples ventajas (Antoun, 2012). Los microorganismos realizan transformaciones de los compuestos orgánicos del fósforo, se llevan a cabo por mecanismos como alteración en la solubilidad de compuestos inorgánicos, mineralización de los compuestos orgánicos, inmobilización y oxidación-reducción de los compuestos inorgánicos (Quian *et al.*, 2019).

2.3 Fósforo Orgánico.

El fósforo orgánico está compuesto, a su vez, por varias fracciones, desde las más lábiles hasta las más resistentes a la mineralización. No obstante, el componente orgánico central del ciclo del fósforo son los residuos de plantas y animales que liberan compuestos como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ésteres, representando entre un 30 y un 60% (Wei *et al.*, 2016).

El P orgánico es degradado por los MSP que lo liberan en compuestos fosfatados (Quian *et al.*, 2019). El P orgánico tiende a ser adsorbido sobre las arcillas, lo cual hace que tenga más

contenido el suelo arcilloso que el arenoso o limoso. Los residuos orgánicos contienen una gran cantidad de P (Salleh *et al.*, 2011), el cual al ser aplicado a la agricultura puede retornarse en una forma asimilable para las plantas mediante la mineralización que es dada por los MSP (Rittmann *et al.*, 2011), siendo probablemente la opción más ecológica y económica de disponerlo (Owen *et al.*, 2015).

2.3.1 Mineralización.

La mineralización es la conversión microbiana del P orgánico a ortofosfato. El P orgánico puede ser mineralizado mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por los MSP presentes (Wyciszkievicz *et al.*, 2016). Este proceso está mediado por las enzimas fosfatasas que pueden ser sintetizadas por las raíces de las plantas, las cuales producen fosfatasas ácidas (Ridge & Rovira, 1971), como por los hongos y bacterias capaces de producir fosfatasas ácidas y alcalinas. Entre los compuestos orgánicos del fósforo que comúnmente pueden estar presentes en el suelo se encuentran la lecitina, los ácidos nucleicos y el ácido fítico los cuales en presencia de fuentes de carbono y nitrógeno de fácil asimilación para los microorganismos pueden ser degradados por acción de estas enzimas liberando fósforo en forma de fosfatos (Ordoñez *et al.*, 2016).

Para lograr una cantidad de mineralización del P los microorganismos utilizan las enzimas fosfatasas y fitasas (Menezes-Blackburn *et al.*, 2017), donde las fitasas son de interés especial porque separan fosfatos de la molécula de fitato, que es la forma más abundante de P orgánico (Greiling *et al.*, 2019).

2.3.2 Microorganismos Benéficos en la Composta.

El compost se considera una fuente de microorganismos efectivos y valiosos para fines de biológicos (Wang et al., 2018). Numerosas publicaciones han demostrado que los compost maduros pueden proporcionar una rica fuente de microorganismos promotores de crecimiento vegetal, transforma nutrientes de los ciclos biogeoquímicos y reducen el uso de fertilizantes (Sreevidya & Gopalakrishnan, 2017). De acuerdo con Azim et al. (2018) el compostaje se divide en dos fases principales; la primera con un alta actividad microbial y la segunda, es la conversión de la materia orgánica a sustancias húmicas. Lo que sugiere que la dinámica microbial mantiene un amplio margen de condiciones fisicoquímicas determinando así las sucesiones de microorganismos. La comprensión de esta dinámica detallada crucial para lograr la optimización del proceso y el potencial de los nichos de microorganismos (Sundberg et al., 2013).

2.4 Microorganismos Solubilizadores de Fosfato.

Algunos microorganismos solubilizan el fosfato con procesos como producción de ácidos orgánicos, fosfatasas, quelación e intercambio de reacciones (Hamim *et al.*, 2019). Estos procesos no solo compensan los altos costos de fabricación de fertilizantes en la industria, sino que también movilizan los fertilizantes adicionados al suelo (Kumar *et al.*, 2017).

Diversos investigadores han reportado la capacidad que tienen diferentes especies bacterianas para solubilizar compuestos fosfatados inorgánicos insolubles como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxapatita y roca fosfato (Chen *et al.*, 2011; Dotaniya *et al.*, 2014) se incluyen bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluso algunas especies de *Streptomyces* que poseen

la capacidad de disolver fosfatos insolubles dentro de los cuales podemos encontrar *Streptomyces griseus* (Sahandi *et al.*, 2019).

De igual forma, se han reportado otros microorganismos solubilizadores de fosfato como: *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *Paenibacillus macerans*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. taylorae*, *E. asburiae*, *Kluverya cryocrescens*, *Pseudomonas stutzeri* entre otros (Cisneros *et al.*, 2017).

En un estudio hecho por Pandey & Putatunda (2018), se obtuvieron un total de diez aislamientos bacterianos diferentes del suelo de la rizosfera de papa recolectados de diferentes lugares. De estos, se caracterizó *Enterobacter cancerogenus* D-m-2, que tiene potencial para solubilizar fosfato inorgánico insoluble. *Enterobacter cancerogenus* D-m-2 mostró una solubilización máxima de fosfato con lactosa como fuente de carbono y oxalato de amonio como fuente de nitrógeno. El valor final de la solubilización de fosfato in vitro por el aislado fue de 8,37 µg / ml.

Otro estudio realizado por Linu *et al.* (2018), donde se aislaron 12 microorganismos solubilizadores de fosfato de la rizosfera mediante técnica de cultivo de enriquecimiento. La eficiencia de solubilización de P se verificó utilizando el método de color amarillo fosfórico vanadomolibdato. Se evaluaron los parámetros pH, temperatura de incubación, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, en los mejores aislados que fueron la *Pseudomonas aeruginosa* PS 2 (KR270346) y *Pseudomonas aeruginosa* PS 3 (KR270347). La tasa máxima de solubilización de P se mostró a pH 7, temperatura 30 ° C y después de 15 días de incubación. La glucosa y el sulfato de amonio fueron las mejores fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente para las cepas seleccionadas. La solubilización

de fosfato mineral se relacionó directamente con una caída del pH en el medio de cultivo.

2.4.1 Fosfatasas.

Un mecanismo para la solubilización-mineralización de fósforo es por medio de enzimas conocidas como fosfatasas que son producidas por microorganismos y donde su liberación se estimula en condiciones específicas (Cerón & Aristizábal, 2012). El término fosfatasas se emplea para designar a un amplio grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico; según la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica las clasifico de acuerdo con el tipo de enlace éster y el compuesto sobre el que actúan, se dividen en monoésterfosfato hidrolasa, diésterfosfato hidrolasa, trifosfato monoéster hidrolasa, difosfato monoéster hidrolasa y triésterfosfato hidrolasa (Behera *et al.*, 2017). Dentro del grupo de las monoésterfosfato hidrolasas se encuentran las fosfatasas alcalinas y las fosfatasas ácidas conocidas como fosfomonoesterasa alcalina y fosfomonoesterasa ácida, son enzimas inespecíficas que catalizan la ruptura hidrolítica del fósforo orgánico del enlace éster (C-O-P), dejando el fósforo inorgánico disponible para que pueda ser asimilado (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) (Paul & Sinha, 2017).

Las fosfatasas ácidas son excretadas por las raíces de las plantas y por los microorganismos para hidrolizar el fósforo orgánico liberando ortofosfatos que es fósforo disponible y quedando en la rizosfera (Khan *et al.*, 2016). La fosfatasa alcalina para su acción se desenvuelve en un pH óptimo de 9-11, se incluyen las nucleasas y fosfolipasas (Pant & Warman, 2000).

En el grupo de las diésterfosfato hidrolasas ó fosfodiesterasas, se encuentran las nucleasas que catalizan la hidrólisis de ácidos nucleicos (ribo y desoxiribonucleico) liberando nucleótidos, y las

fosfolipasas que catalizan la hidrólisis de fosfolípidos (Anand *et al.*, 2016).

También se incluyen las nucleotidasas que son las encargadas de la hidrólisis de nucleótidos liberando una molécula de fosfato, o las azúcar fosfato fosfohidrolasas que hidrolizan azúcares fosfatos liberando un fosfato (Xin *et al.*, 2010).

La mayoría del fósforo orgánico presente en el suelo está en forma de fosfatos de inositol, las monoesterfosfato hidrolasas (fitasas y fosfomonoesterasas) son las fosfatasas más estudiadas. Algunos microorganismos productores de estas enzimas son: *Rhizobium sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp* (Rasul *et al.*, 2019).

Si la disponibilidad de fosfato es baja, las enzimas pueden persistir por largos periodos de tiempo cuando están protegidas por minerales de arcilla y coloides húmicos, que les brinda una gran resistencia a la desnaturalización térmica, deshidratación y proteólisis (Bakhshandeh *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Ghosh *et al.*, (2018), se mezclaron los residuos de la fábrica de té con estiércol de ganado en diferentes proporciones para evaluar la posibilidad de reciclar los residuos de té mediante vermicompostaje. Se observó que las lombrices de tierra (*Eudrilus euginae* utilizadas en este estudio) solo podían sobrevivir cuando los residuos de té se mezclaban con estiércol de ganado en una proporción 1: 1. Se obtuvo que la enzima fitasa, medida en materiales de vermicompostaje, se relacionara positivamente con la cantidad de P mineralizado. Se observó que la enzima fosfatasa ácida contribuyó a la mineralización de P en los primeros 50 días, mientras que la enzima fitasa contribuyó en la última parte del vermicompostaje.

2.4.2 Fitasas.

Son un tipo de fosfatasa que permiten la liberación del fosfato a partir de la hidrólisis de fitatos que se encuentran en el ácido fitico (hexafosfato de inositol) disponible en los restos vegetales presentes en el suelo (Ghosh *et al.*, 2018). Estas enzimas se encuentran distribuidas en las plantas, tejidos de animales y microorganismos de los cuales se han reportado bacterias Gram negativas como *Bacillus sp.*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *E.coli* (Makoudi *et al.*, 2018).

En la actualidad las fitasas son de gran interés biotecnológico por su aplicabilidad en el mejoramiento de cultivos. Es probable que estas enzimas estén reguladas por la expresión de genes que codifican su función en la mineralización de fósforo (Zhu *et al.*, 2018).

En un estudio, realizado por Layton *et al.*, 2018, se confirma la importancia de las fitasas en el mecanismo de solubilización de fosfato. Las bacterias Gram positivas, del género *Bacillus* y *Paenibacillus*, poseen esporas que las hacen resistentes a condiciones adversas, como en suelos de origen volcánico que tienen un pH altamente ácido y que contienen grandes cantidades de fitato. Estas bacterias son capaces de utilizar el fitato como única fuente de fosforo, ya que son portadores de genes que codifican para las enzimas fitasas y pueden sobrevivir mejor que las bacterias Gram negativas (Layton *et al.*, 2018).

Los autores señalan que las fitasas tuvieron una alta actividad en suelos alcalinos lo que corrobora la información sobre la función de la enzima (puede actuar en distintos valores de pH). Sin embargo, el estudio explica que el tipo y cantidad de fitasas si pueden depender del pH y de las condiciones químicas del suelo; cabe destacar que la composición de la población microbiana también

se ve afectada por factores como el tipo de suelo, fertilización, genotipo y edad de la planta. Se ha descrito que la fitasas β -helice (BPP) es predominante en el género *Bacillus* y considerada como la más importante en el proceso de la función solubilizadora de fosfato (Layton *et al.*, 2018).

En otro estudio realizado por Delfim *et al.*, (2018), evaluaron la disponibilidad de P en el trigo, en suelos derivados de la ceniza volcánica e inoculados con *Bacillus thuringiensis* solubilizante de fosfato, el experimento se realizó en macetas en condiciones de invernadero utilizando un diseño completamente al azar. Las plantas de trigo se inocularon y se volvieron a inocular a los 20 y 46 días después de la siembra (DAS), respectivamente, con *B. thuringiensis.*; y, el muestreo de suelo y planta se realizó después de 46, 66 y 87 días en base a la escala de crecimiento de Zadoks (Z). La inoculación resultó en un aumento del 11% en P de la rizosfera en Z46 (Ultisol), también se aumentó el P en 34% y 67% en los tejidos aéreos en Z46 (Andisol y Ultisol), respectivamente, mientras que se observó un aumento del 75% en la raíz. . De manera similar, la inoculación produjo aumentos en la actividad de la fosfatasa ácida (Andisol), la biomasa microbiana del suelo (Andisol y Ultisol) y la biomasa de la raíz en plantas (Ultisol), sin un aumento de la biomasa aérea de las plantas.

2.4.3 Producción de ácidos orgánicos.

Existen distintos mecanismos de solubilización de fósforo, asociados a materia orgánica mediado por microorganismos; las enzimas y el segundo que es mediante la producción de ácidos orgánicos, que actúan sobre compuestos insolubles de fosfato inorgánico como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica (Moharana & Monroy, 2016). Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el oxálico, cítrico,

láctico succínico, isovalerico, isobutírico y acético, se producen como resultado de la descomposición de la materia orgánica (Basak & Biswas 2016). La cantidad y tipo de ácidos orgánicos depende de los tipos de microorganismos. La presencia de los ácidos orgánicos para la solubilización del P implica un descenso en el pH hasta valores próximos a 2, valores necesarios para que se pueda llevar a cabo la solubilización (van Haandel *et al.*, 2017). La producción de ácidos orgánicos a partir de la fermentación de la glucosa da como resultado la acidificación de la célula y sus alrededores (Halder & Chakrabartty, 1993).

Otro mecanismo por el cual los ácidos orgánicos actúan es por competencia con el fósforo por los sitios de absorción cuando se encuentran en su forma aniónica, aumentando de esta manera la solubilización del fósforo, al cambiar las cargas superficiales en los adsorbentes o diluyendo los adsorbentes (Shin *et al.*, 2015). Se ha investigado que los ácidos orgánicos forman complejos solubles con iones de metales como el Ca^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} que están asociados a fósforo insoluble, haciendo que el fósforo quede en forma disponible, reduciendo la adsorción (Rasoulnia & Mousavi, 2016).

2.4.4 Inmovilización.

La inmovilización se presenta en las formas disponibles de P que son consumidas por microorganismos, es decir, cuando el P se convierte en P orgánico representado en biomasa (Morais & Gatiboni, 2015).

2.5 Aspectos generales de *Bacillus* sp.

El género *Bacillus* sp. es el más representativo del grupo de solubilizadores de fosfato, se encuentra presente en el suelo, agua, vegetales y aire, poseen diversos mecanismos de supervivencia como la formación de esporas centroméricas ante situaciones

adversas, hasta encontrar las condiciones favorables para su crecimiento, con una gran capacidad metabólica que conlleva a que su colonización en la rizósfera sea exitosa (Logan & Vos, 2015).

Son bacterias Gram positivas pertenecientes a la familia *Bacillaceae*, tienen forma de bastón y su tamaño varía de 0.5 x 1.2 a 2.5 x 10 µm con terminaciones cuadradas que se disponen en largas cadenas, aerobios o anaerobios facultativos, móviles con flagelos laterales, saprofitos, la mayoría de las especies presentan catalasa positiva, su crecimiento se desarrolla favorablemente en ambientes con pH ácido y básico entre un rango de (5.5 - 8.5) y a diferentes temperaturas (-5 °C a 75°C), en agar sangre se observa hemólisis variable, sus características fenotípicas son colonias grandes, con bordes irregulares de color blanco a grisáceo (Menezes *et al.*, 2016).

Entre las especies potencialmente solubilizadoras de P se encuentran: *Bacillus licheniformes*, *B. pumilus*, *B. subtilis* y *B. brevis* (García & Delgado, 2016). El género *Bacillus sp.* es un referente de investigación puesto que representa una amplia aplicabilidad en el campo biotecnológico por sus diferentes usos industriales y ambientales (Richardson & Simpson, 2011).

Los biofertilizantes a base de microorganismos benéficos han sido objeto de investigaciones puesto que su aplicabilidad en los suelos presenta una mayor eficacia y la planta puede disponer de mayor fósforo soluble (Martínez *et al.*, 2010). Esta alternativa minimiza notablemente el impacto ambiental que producen los fertilizantes químicos, mejorando el rendimiento de los cultivos y limitando el uso de estos productos tóxicos para el suelo que conllevan a su erosión (Pineda, 2014).

Saeid *et al.*, (2018) utilizaron tres especies de *Bacillus* y tres tipos de materias primas (huesos de aves de corral, huesos de pescado y cenizas) se analizaron para su solubilización. Se compararon los siguientes parámetros para todos los casos analizados: pH, tasa de crecimiento específica, factor de solubilización, concentración de fósforo liberado y concentración total e individual de ácidos orgánicos. El tipo de materias primas y el tipo de especies de *Bacillus* utilizadas en la solubilización tuvieron una gran influencia en el tipo de ácidos orgánicos que se detectaron en el cultivo en caldo y su concentración total, que tuvo una influencia directa en la cantidad de fósforo liberado. La combinación de *Bacillus megaterium* con los huesos de pescado a 5 g / L se propone como el par que proporciona la mayor concentración de fósforo liberado (483 ± 5 mg / L).

2.6 Medios de cultivo y requerimientos.

Un medio de cultivo es una solución acuosa que contiene varios nutrientes en concentraciones adecuadas para el crecimiento de microorganismos (Anzuay *et al.*, 2017). Para tener éxito en el cultivo de un microorganismo específico es de gran importancia conocer sus requerimientos nutricionales los cuales deben ser suministrados en una forma adecuada para que cumplan con las exigencias de los microorganismos con el fin de que estos puedan sintetizar productos o metabolitos de interés (Ureña & Beriguete, 2018). Los medios de cultivos deben favorecer la nutrición microbiana, y por lo tanto deben estar diseñados para este fin.

Los requerimientos nutricionales se basan en la composición química de la célula, las cuales contienen grandes cantidades de moléculas y macromoléculas (Fry, 2018). Aunque existen muchos elementos, la masa celular se forma primordialmente de carbono, hidrogeno, oxigeno, nitrógeno y de otros elementos presentes en

menor cantidad pero que también son importantes para el desarrollo celular como el fósforo, azufre, potasio, magnesio, sodio, calcio, hierro, entre otros (Ureña & Beriguete, 2018); igualmente los factores de crecimiento son requeridos por los microorganismos en pequeñas cantidades, incluyen vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas (Florido *et al.*, 2017).

El pH del medio es importante para el crecimiento de los microorganismos e influye en los procesos metabólicos. La mayoría de ellos se desarrollan mejor en medios con un pH neutro, aunque los hay que requieren medios más o menos ácidos. Un pH inadecuado puede inhibir el crecimiento o alterar los procesos metabólicos normales (Florido *et al.*, 2017).

2.7 Métodos para determinar la solubilización de fosfatos.

Existen dos categorías para clasificar estos métodos. La primera categoría consiste en métodos para la cuantificación del producto, es decir, en la cuantificación de iones ortofosfato, como producto de la solubilización de los compuestos fosfatados; dentro de estos métodos se encuentran el método colorimétrico del ácido vanadomolibdato fosfato, método Mo-Blue, método verde de malaquita (Rodríguez *et al.*, 2013). Otra categoría consiste en métodos para la cuantificación de actividad enzimática, que cuantifica la cantidad de enzima fosfatasa producida por los microorganismos fosfato solubilizadores, para esto, se emplea el método de p-nitrofenilfosfato (Qvirist *et al.*, 2015).

2.7.1 Método colorimétrico.

El principio del método colorimétrico del ácido vanadomolibdato fosfato se basa en que una solución diluida de ortofosfato de molibdato amónico reacciona en condiciones ácidas para formar ácido molibdofosfórico. En presencia de vanadio, se forma ácido vanadomolibdofosfórico amarillo; la intensidad del color amarillo es

proporcional a la concentración de fosfato liberado como fósforo soluble (Cañez & Garcia. 2015). Para la determinación de fosfatos por el método colorimétrico se debe realizar en primer lugar una curva de calibración en concentraciones conocidas de fosfatos, que relacionará la absorbancia de la solución en función de la concentración de fosfatos (Qvirist *et al.*, 2015). En cuanto al método Mo-Blue o método del molibdovanadato la determinación de fósforo en solución acuosa se basa en la formación de un ácido fosfoantimolibdeno azul en la presencia de ácido ascórbico (Murphy & Riley, 1962); en solución sulfúrica los iones ortofosfato reaccionan con los iones molibdato, dando ácido molibdofosfórico, el cual con ácido ascórbico, se reduce a azul de fosfomolibdeno presentando al cabo de 5 minutos una coloración azul, esta prueba se realiza por medio del Test de Fosfatos SPECTRÓQUANT® FÓSFORO (PMB) MERCK . Es una de las técnicas utilizadas para medir la cantidad de fosfato soluble que se produce en suelo gracias a las bacterias solubilizadoras de fosfato (Chen, *et al.*, 2006), además es más preciso que el método verde de malaquita (Peñeta & Esquivel, 2018), una de las principales ventajas es que es necesario solo pequeñas muestras para el análisis (Correa & Oviedo, 2017). Una desventaja de este método (método del molibdovanadato) es que cuando existen concentraciones muy bajas de fósforo, no las cuantifica, pues tiene una baja sensibilidad (He *et al.*, 2010).

2.7.2 Método p-nitrofenil fosfato.

Para evaluar la actividad de las fosfatasas, se utiliza un sustrato orgánico (p-nitrofenilfosfato), la concentración del producto de la hidrólisis (p-nitrofenol) es proporcional a la actividad de la fosfatasa. El principio de la técnica se basa en el uso de una fracción artificial de un sustrato orgánico (p-nitrofenilfosfato) el cual

es hidrolizado por fosfatasas del tipo fosfomonoesterasas para obtener HPO_4 . (Bobadilla & Vanegas, 2008).

El sustrato más habitual es el p-nitrofenil fosfato, que es un fosfato monoéster mineralizado por fosfatasas ácidas y alcalinas en el suelo. Para probar la actividad de cualquiera de estas clases de fosfatasas, basta ajustar el pH del medio de incubación, estableciendo condiciones ácidas o alcalinas y en casi todos los ensayos para fosfatasa se emplea actualmente p-nitrofenilfosfato como sustrato, ya que es incoloro y por acción de la fosfatasa se transforma en p-nitrofenol a partir del cual se genera p-nitrofenolato que produce el color amarillo en condiciones alcalinas (Conney, 2000). Por esta razón, el aumento de coloración amarilla con el tiempo de incubación, medido a 450 nm con un espectrofotómetro, es un indicador del nivel en el que el sustrato (p-nitrofenil fosfato) es hidrolizado por la fosfatasa una vez que la reacción se detiene y la solución se alcaliniza (Conney, 2000).

Una unidad fosfatasa (UP) se expresará como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto por ml (Bobadilla & Vanegas, 2008).

III. OBJETIVOS E HIPOTESIS

3.1 Hipótesis

Bacillus pumilus aislado de composta presenta actividad enzimática de tipo fosfatasa y fitasa con base en la fuente de la que fue aislada. Estas actividades se pueden optimizar manejando condiciones de temperatura y agitación de un cultivo *in vitro* de esta bacteria.

3.2 Objetivo General

Determinar y optimizar *in vitro* la actividad enzimática fosfatasa y fitasa presentes en *B. pumilus* aislado de composta.

3.3 Objetivos específicos

Determinar actividad enzimática tipo fosfatasas y fitasas en el aislado de *Bacillus pumilus*.

Optimizar la actividad enzimática tipo fosfatasas y fitasas *in vitro* para *Bacillus pumilus* aislado de composta.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Ubicación del experimento.

El área donde se desarrolló el experimento fue en los Laboratorios de Microbiología y Biología Molecular del Campus Amazcala de la Facultad de Ingeniería, de la Universidad Autónoma de Querétaro, ubicado en la carretera a Chichimequillas s/n, km. 1 en el municipio de El Marqués Querétaro, y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Química, Centro Universitario, UAQ.

4.2 Determinación de la actividad enzimática tipo fosfatasas y fitasas en el aislado de *B. pumilus*.

El *Bacillus pumilus* fue aislado de la composta realizada en el campus de Amazcala, la cual se encontraba en su fase de maduración y la identificación correspondió a una tesis de Maestría de Biosistemas, en la cual se tomó el aislado para la prueba de la presencia de las enzimas tipo fosfatasas y fitasa. Sembrándolo en Agar nutritivo a una temperatura de 28°C durante tres días, para su activación y continuar con los medios selectivos de fósforo orgánico.

4.2.1 Preparación de Medios selectivos

4.2.1.1 Fosfatasas

Se preparó de acuerdo con M. A. Tabatabai and J. M. Bremner (1969), donde se elaboró la solución modificada universal buffer (MUB por sus siglas en inglés) que es la base de los medios; se utilizaron tres matraces Erlenmeyer con 200 ml de H₂O mezclándose con Tris, ácido maleico (C₄H₄O₄), ácido cítrico (C₆H₈O₇) y ácido bórico (H₃BO₃) asegurando que quede completamente diluido.

Con el Hidróxido de sodio (0.5 M), y un potenciómetro (JW-3510) se logró conseguir los pH requeridos para las fosfatasas ácidas (fa)

de pH 6.5, fosfatasa neutras (fn) de pH 7 y fosfatasa básicas (fb) de pH 11. Se adicionó a cada matraz 3% de Agar Agar para llevar a cabo la solidificación de los medios. Después de la esterilización se añadió p-nitrofenil fosfato tetrahidrato di sódico a cada matraz.

4.2.1.2 Fitasas

Se usaron dos formulaciones para las fitasas (fi):

En la primera se utilizó una formulación para fitato de Ca de 200ml, la base de ácido fítico contiene agua desionizada para la disolución y se adicionó Carbonato de calcio (CaCO_3) hasta alcanzar una mezcla homogénea.

Con la solución de Hidróxido de amonio (1.25%), se llevó la mezcla al pH deseado (5.5) (Neevel, Reissland, Scheper, & Fleischer, 2007). Por último, se adiciono Agar al 3%.

El segundo fue modificado sin dextrina, utilizando fitato de sodio, de extracto de levadura, extracto de carne y 0.06g de sulfato de magnesio(Mg SO_4), diluyéndose en agua destilada y antes de esterilizar se adiciono 0.01% de cloruro de calcio (CaCl_2) (Rocky-Salimi, Hashemi, Safari, & Mousivand, 2016), se agrego Agar al 3%.

4.2.2 Inoculación de *Bacillus pumilis* en los medios selectivos

Se sembró a *Bacillus pumilis* por el método de punteo realizado con el asa en varios puntos distribuidos en la caja Petri. Los medios selectivos se colocaron de forma diferencial en cajas petri, por triplicado. Esto se evaluó en una cinética de 12 horas, donde se evidencio la presencia del tipo de enzimas fosfatasa y fitasa por fotografía en el tiempo de muestreo.

4.3 Optimización de la actividad enzimática tipo fosfatasa y fitasas in vitro para *Bacillus pumilus* aislado de composta.

4.3.1 Cinética con *Bacillus pumilus*, variando las condiciones de agitación y las fuentes de fósforo orgánico.

Se inoculó a *B. pumilus* en matraces Erlenmeyer con los medios selectivos para cada tipo de enzima y un medio no inoculado para cada tipo de enzima como control, todo se realizó por duplicado.

Los matraces se colocaron en un Agitador orbital (4300 w), a velocidades de agitación de 0(T1), 100(T2), 200(T3) rpm a una temperatura de 30°C. La cinética se realizó durante 16 horas, comenzando la medición cada hora las dos primeras horas y después cada dos horas hasta terminar, se recolectaron 3 alícuotas de cada matraz en tubos eppendorf.

Las alícuotas fueron llevadas al laboratorio y se centrifugaron a 10,000 rpm durante cinco minutos, el sobrenadante para la unidad enzimática se vació en celdas de cuarzo y se midió la absorbancia por triplicado a 420 nm con un espectrofotómetro UV-Vis y se extrapolaron los valores en la curva estándar determinada usando las soluciones diluidas en serie de p-nitrofenol. Se guardó una alícuota centrifugada para su posterior análisis de contenido de proteína.

4.3.2 Obtención de la concentración de proteína por el método de Bradford de las alícuotas enzimáticas de la cinética.

Para la determinación de concentración de proteína se utilizó el método de Bradford, se realizó una curva de calibración con 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, para la curva de calibración.

Después de hacer la curva de calibración se preparó la solución de dilución de Bradford que consiste en 4 ml de agua des ionizada 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 μL y se completó a 200 μL con la solución de dilución. Se midió la absorbancia a 595 nm y se determinó la concentración de proteína.

4.3.3 Evaluación de la máxima unidad de actividad específica enzimática de la *Bacillus pumilus*.

Por medio de Excel se hicieron los cálculos para obtenerla unidad enzimática (U), los cuales se realizaron el peso molecular del producto, el volumen de la muestra analizada y la concentración enzimática. La concentración de proteína se obtuvo de la curva, y para la actividad enzimática se dividió U entre la concentración de la proteína.

4.4 Diseño experimental

El diseño experimental aplicado fue completamente al azar y consistió en tres tratamientos (T0, T100, T200), con cuatro repeticiones cada uno como se muestra en la figura 4.1. Todos los tratamientos se midieron a 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12,14 y 16 horas en una temperatura de 30 °C durante la cinética.

Diseño Experimental

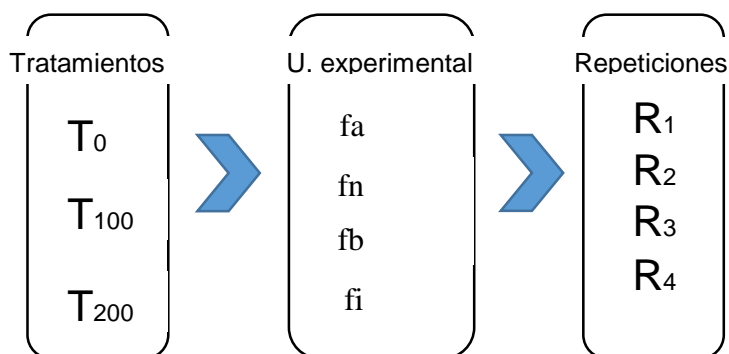


Figura 4.1 Diseño experimental

4.4.1 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, los datos se analizaron por medio de un ANOVA de dos vías. La comparación de medias de los tratamientos se realizó mediante la prueba de Tukey al 0.05% de probabilidad, por medio del programa estadístico Statgraphics.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación de la actividad enzimática tipo fosfatasas y fitasas en el aislado de *B. pumilus*.

Los resultados obtenidos en la cinética para el medio de pH Ácido en la segunda hora la bacteria *Bacillus pumilus* mostro un leve crecimiento y a la hora 10 aumento considerablemente.

En el medio de pH neutro, de igual forma hizo su aparición la bacteria *Bacillus p.* empezando a notarse a la cuarta hora, duplicándose otra colonia con otro punto a la sexta hora y así se mantuvo hasta la última hora, las 3 bacterias restantes no crecieron.

En el medio de pH básico la bacteria *Bacillus p.* mostró un crecimiento a la hora dos y este se mantuvo constante hasta el final.

En los medios para fitasas, en el fitato de calcio a la primera hora hubo crecimiento de tres colonias de *Bacillus p.* y permaneció así por las 12 horas. En el medio de Rocky a la primera hora se desarrolló *Bacillus p.* en tres colonias y a la octava hora se mantuvo.

En la figura 5.2 se muestra la cinética de *B. pumilus* a la hora doce en los medios para cada enzima.

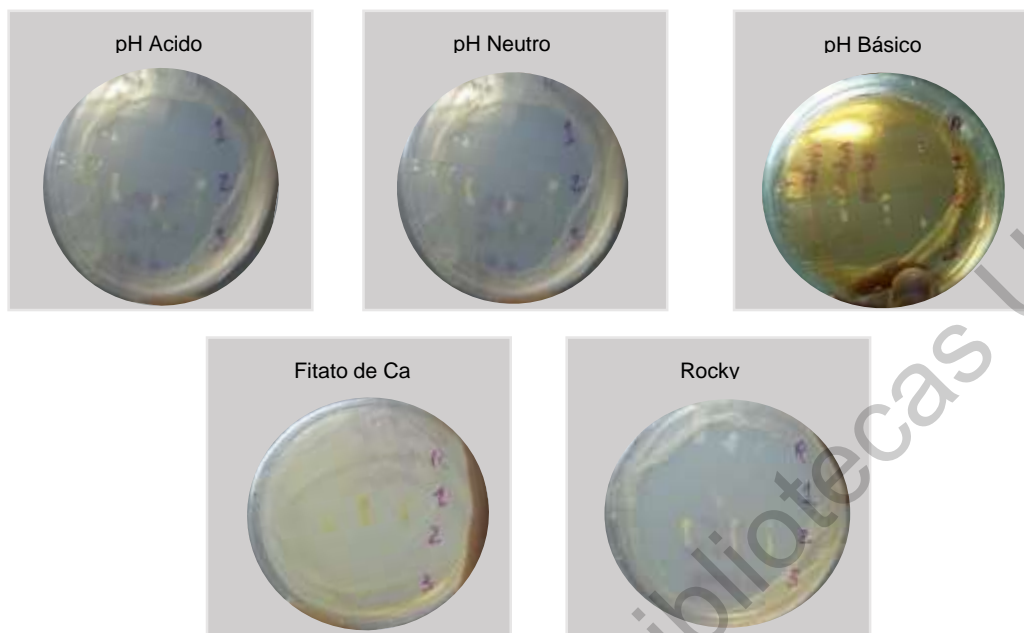


Figura 5.2. Cinética de *B. pumilus* en los diferentes medios (pH ácido, pH neutro, pH básico, Fitato de Ca y Rocky) a la hora 12.

Se pudo ver que *B. pumilus* contiene enzimas solubilizadoras de fosfato ya que se formaron halos en las colonias en los medios selectivos, sin embargo en algunos medios selectivos utilizando una fuente diferente de fósforo orgánico no fue significativo debido a que las bacterias no lo pueden utilizar por lo tanto no se pudieron obtener aislados (Behera *et al.*, 2017). De esta manera el medio para la solubilización de fosfato el NBRIP es un medio correcto para identificar microorganismos solubilizadores de fosfato ya que facilitó la identificación de la actividad enzimática por observación visual y es el cual usamos (Behera *et al.*, 2017).

La influencia de la prueba de las fitasas es importante debido a que son la forma principal de almacenamiento de fósforo en la planta y el componente principal de la fracción orgánica de P (Menezes *et al.*, 2016), se ha observado que al agregar PSB al suelo incrementó

la disponibilidad de fósforo debido a la liberación de fitasas exógenas (Solanki *et al.*, 2018). Se han reportado grandes cantidades de enzimas alcalinas en suelos tratados con estiércol (Abujabhah *et al.*, 2016), por lo cual el encontrar a *B. pumilus* de la composta, que creció en todos los medios de las fuentes de fósforo orgánico nos indica que hay un potencial de bacterias presentes en los residuos de composta y la cual se seleccionó por su rapidez de crecimiento que se dio durante las primeras 6 horas.

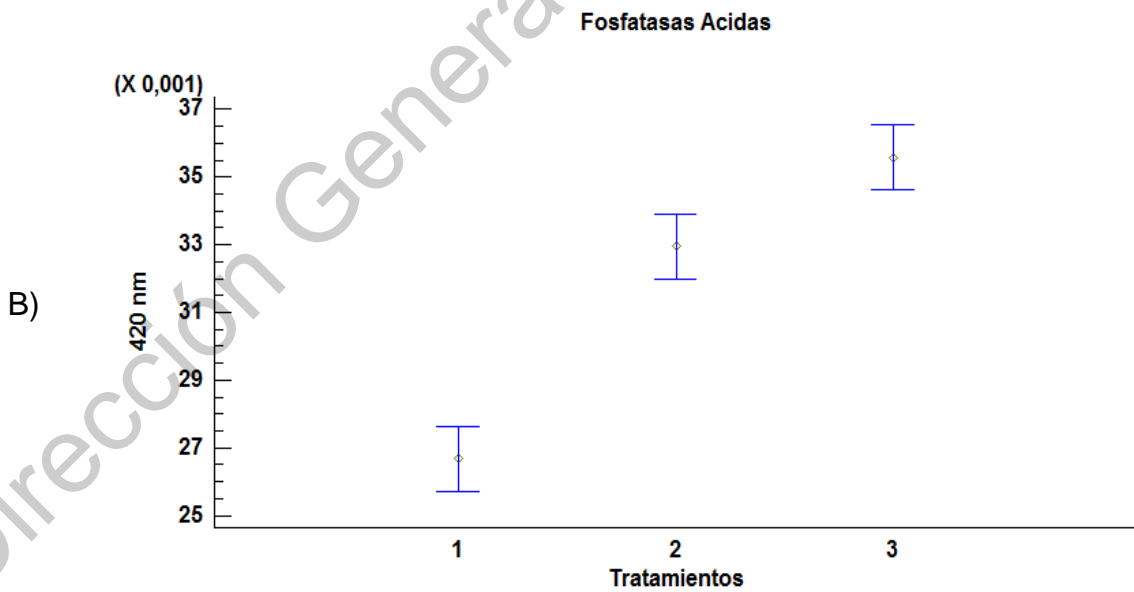
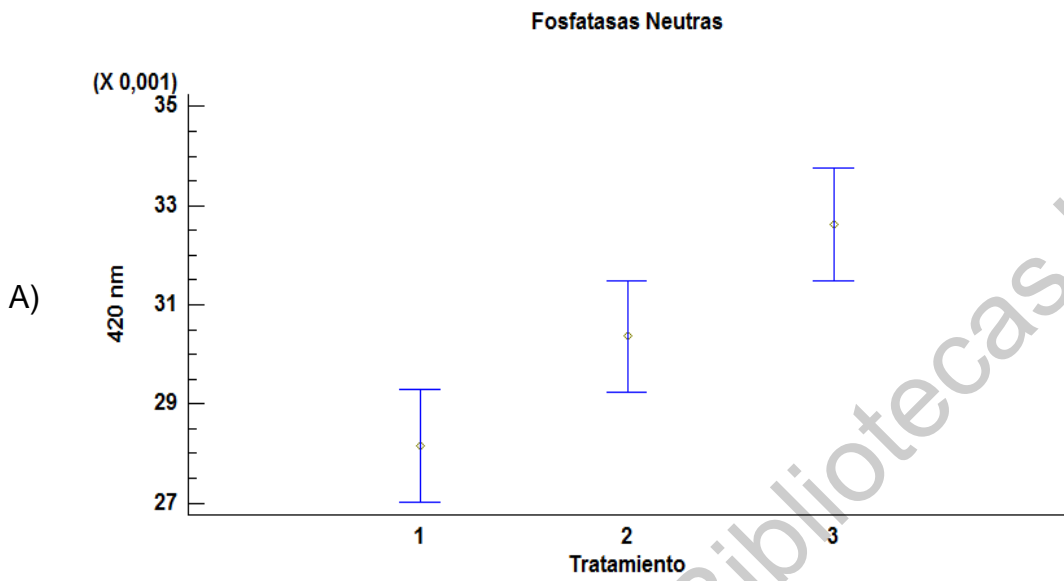
5.2 Optimización de la actividad enzimática tipo fosfatasa y fitasas in vitro para *Bacillus pumilus* aislado de composta.

5.2.1 Resultados de la cinética enzimática.

Los resultados obtenidos de las pruebas de las enzimas fosfatasa básicas y neutras tienen una similitud entre T1-T2, siendo mayor T3 con un valor de 0.04438, 0.04489 U que fueron a la hora 12 y 10 respectivamente. En las fosfatasa ácidas su punto máximo fue el de T3 con un valor de 0.04924 U en la hora 10 y para las fitasas en T2 con 0.09822 U hora 12.

Las medias de los tratamientos en las básicas T1, T2, T3 son parecidas pero T3 es aún mayor con una media de 0.0472 U. Los tratamientos de fosfatasa ácidas y neutras se puede observar que T3 es mayor con una media de 0.03262 U para neutras y 0.03255 U para ácidas. En las fitasas la media mayor fue en T2 con un valor de 0.05865 U.

La figura 5.3 se muestra los resultados obtenidos del análisis de varianza de la cinética de las enzimas fosfatasa teniendo diferencia significativa para evaluar por Tukey cual tratamiento tiene la mayor unidad enzimática, donde el T3 presentó el valor alto para las fosfatasa neutras, básicas ácidas. Para las fitasas el T2 tiene el mayor valor.



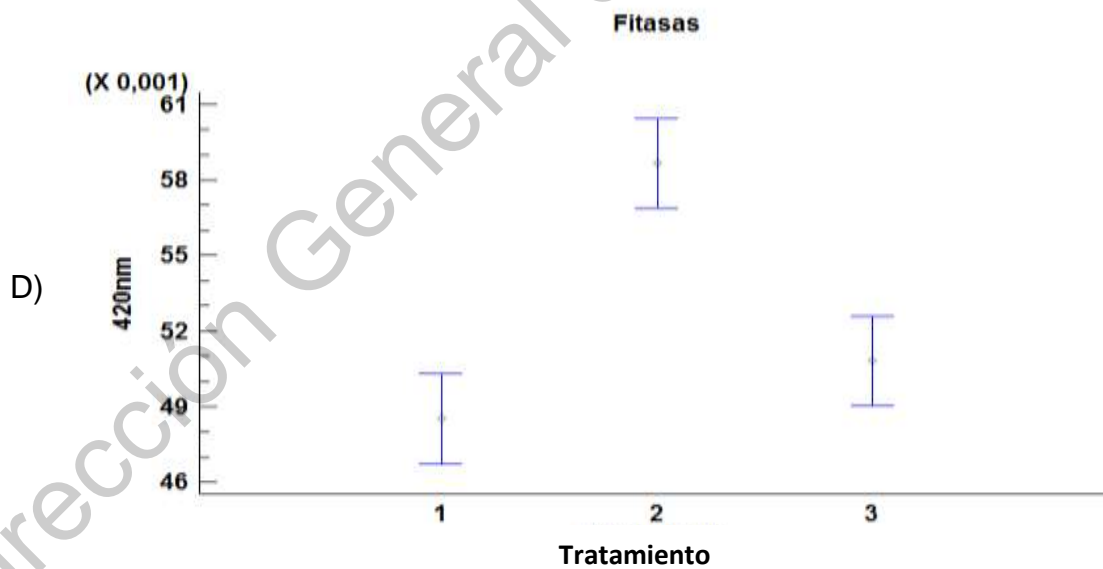
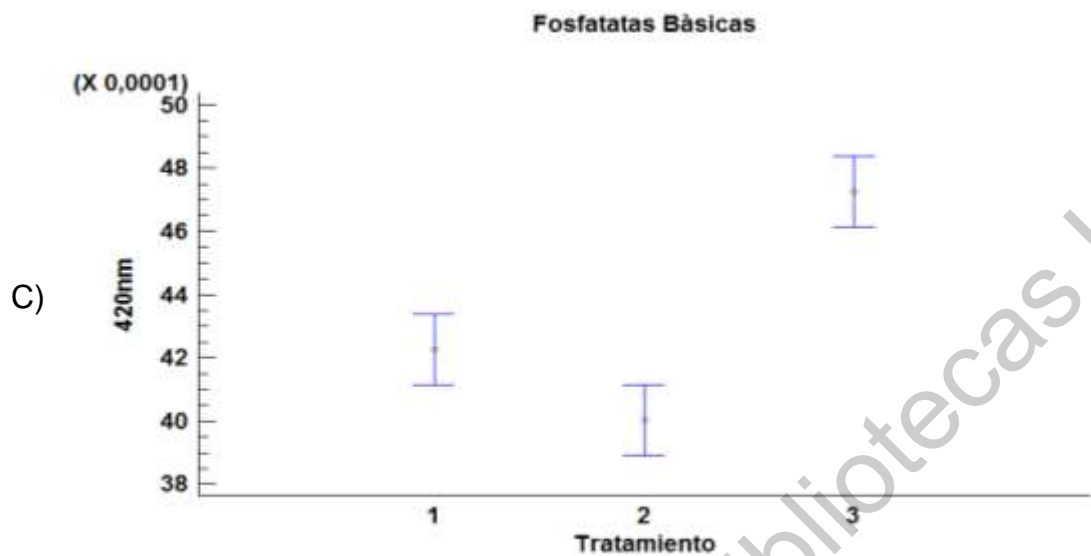


Figura 5.3. Prueba de Tukey $\alpha=95\%$ para las enzimas; A) Fosfatatas Neutras, B) Fosfatatas Acidas, C) Fosfatatas Básicas y D) Fitasas.

La actividad de las enzimas fosfatasas varia con el pH (Behera *et al.*, 2017), a lo cual se puede interpretar las diferentes cantidades que obtuvimos de las fosfatasas en los diferentes pH (alcalino, ácido y neutro), donde se obtuvo que la *Bacillus pumilus* en el caso de las fosfatasas prefiere el medio ácido con una mayor cantidad.

La velocidad de la agitación tiene directa influencia sobre las enzimas una mayor agitación incrementa la presión de oxígeno pero a la vez puede no incrementarse la producción de enzimas porque puede dañarse su estructura o verse afectada (Wojtusik, 2018), de esta manera podemos interpretar que velocidad de agitación para la producción de fosfatasas el mayor nivel de 200 rpm fue el adecuado y en el caso de las fitasas la velocidad de un nivel menor de 100 rpm fue significativa donde no podemos determinar que haya existido un daño a la estructura enzimática, pero si sabemos que hubo una reducción en su cantidad por lo cual hacer análisis o experimentos de velocidades de agitación para producción enzimática son determinantes (Behera *et al.*, 2017).

Por otra parte la producción de las enzimas extracelulares está influenciada por cambios de temperatura como por las propiedades físicas de la membrana celular (Ávila & González, 2019). No hicimos una evaluación de diferentes niveles de temperatura porque conocemos que la *B. pumilus* se desarrolla correctamente en temperaturas mesofílicas por lo cual decidimos utilizar la temperatura constante de 30°C, dejando abierto que puede haber rangos diferentes de temperatura con mayor o menor unidad enzimática.

5.2.2 Resultados de la concentración de proteína.

En la figura 5.4 los resultados mostraron que se incrementa la concentración de proteína conforme avanza el tiempo, alcanzando la máxima concentración al final. Para las fitasas con 0.4313 mg/ml, las fosfatasas básicas con 0.3459 mg/ml y neutras con 0.3621 mg/ml presentaron mayor concentración a 200 rpm. Las fosfatasas ácidas tuvieron mayor concentración en las 0 rpm con un valor de 0.3519 mg/ml.

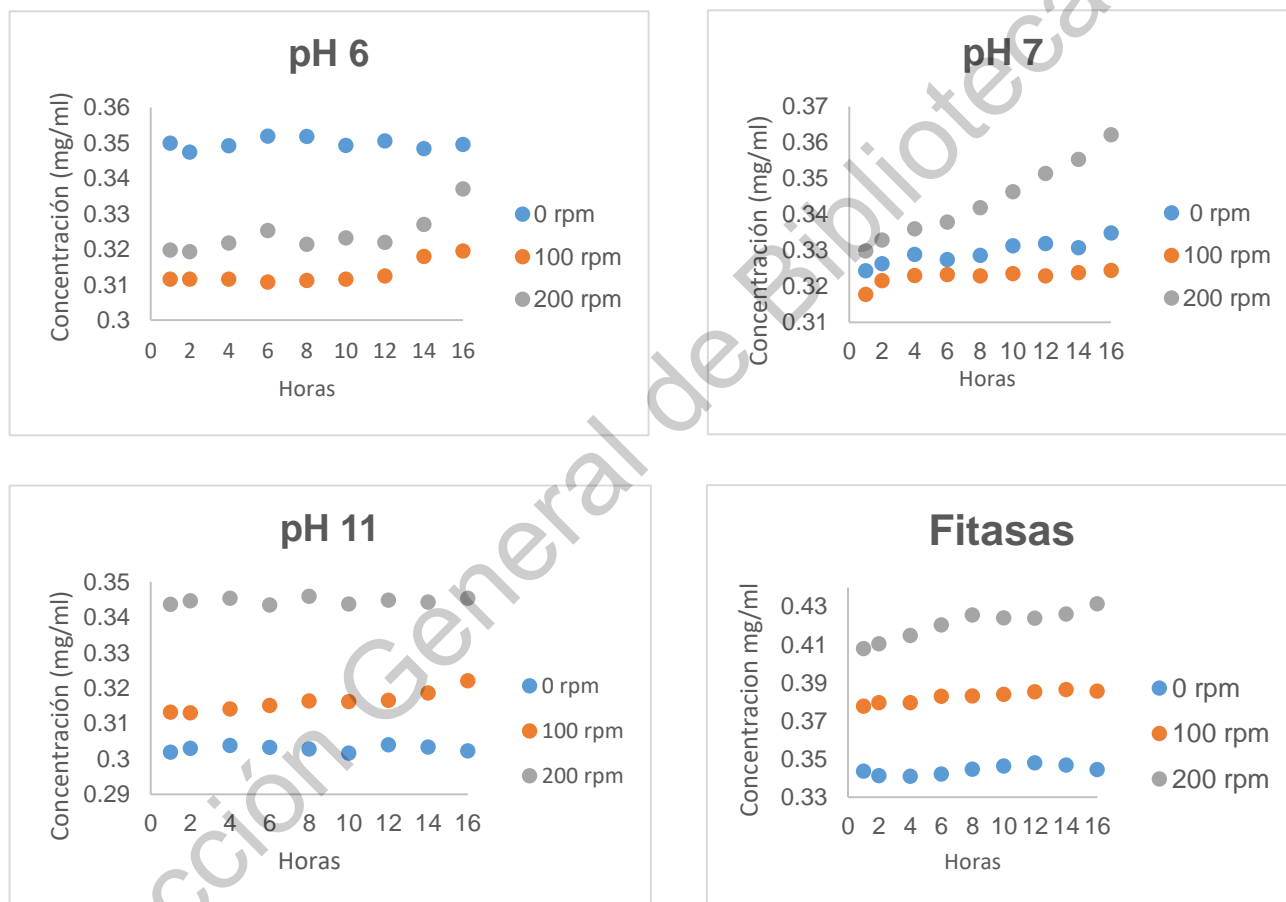


Figura 5.4. Concentración de Proteína obtenida de las distintas enzimas

5.3 Evaluación de la máxima unidad de actividad específica enzimática de la *Bacillus pumilus*.

Los resultados de la máxima unidad de actividad enzimática (figura 5.5) para el caso de las fosfatasas alcalinas, ácidas y neutras se presentaron en las 200 rpm y a la hora 10 con un valor de 0.150 UE para las ácidas, 0.128 UE las neutras y 0.138 UE para las básicas.

La máxima actividad enzimática en las fitasas se alcanzó a las 100 rpm con un valor de 0.131 UE.

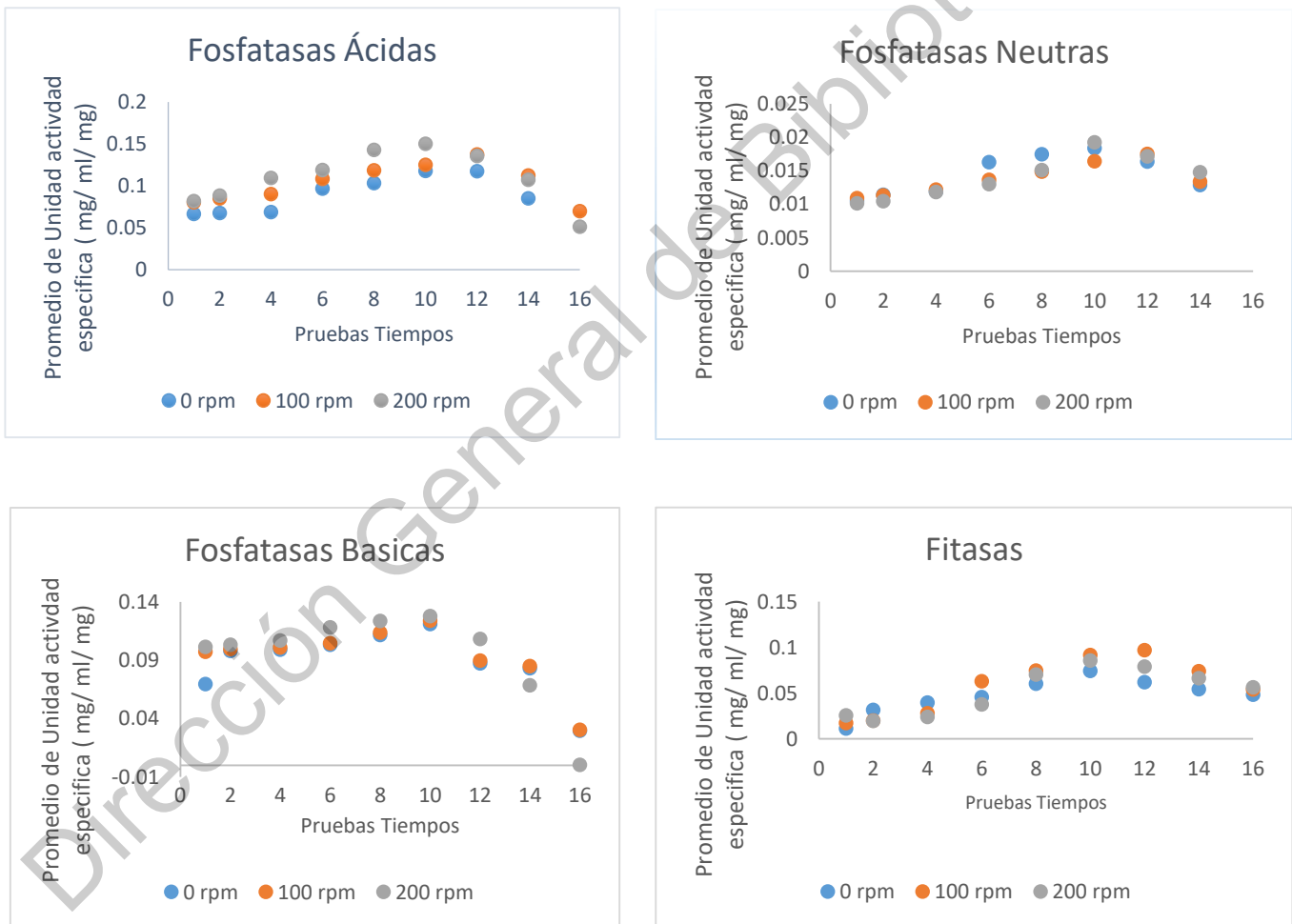


Figura 5.5. Actividad enzimática de *Bacillus pumilus*

Se aisló y se identificó una bacteria PSB de un manglar del río Mahanadi de la India la cual se evaluó su producción de fosfatasa ácida con la diferencia de utilizar una unidad de actividad enzimática bajo sus condiciones de ensayo utilizando un reactivo denominado di sodio p- nitrofenil fosfato (tetrahidrato) obteniendo después de 192 horas de incubación y una mayor actividad enzimática de 76.808 U/ml y se tuvo una optimización de 77.87 U/ml después de 48 horas de incubación (Behera *et al.*, 2017), el experimento que se mostró utilizaron condiciones experimentales y reactivos específicos por lo que obtuvieron su unidad de actividad específica, nosotros utilizamos diferentes reactivos y condiciones experimentales por lo cual nuestros resultados son verídicos.

VI. CONCLUSIONES

B. pumillus, una bacteria gram positiva, es solubilizadora de fosfato y se ha informado que promueve el crecimiento de las plantas, debido a eso puede tener un uso probable como bioinoculante para aumentar la fertilidad del suelo al minimizar la aplicación de fertilizantes, lo que puede promover una agricultura sostenible y ayudar a satisfacer las necesidades futuras.

Este estudio proporciona evidencia de la existencia de bacterias agrícolamente importantes, en las compostas, lo que puede ayudar a su mayor aprovechamiento e incluso para próximas investigaciones.

Conocer las condiciones óptimas para la producción de enzimas reduce costos, y facilita su producción en biorreactores para uso a nivel industrial, de igual forma se pueden hacer próximos estudios para su aplicación en plantas, suelo, agua o animales.

VII. REFERENCIAS

- Abujabhah, I. S., Bound, S. A., Doyle, R., & Bowman, J. P. (2016). Effects of biochar and compost amendments on soil physico-chemical properties and the total community within a temperate agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 98, 243-253.
- Alcántara, E. Á. (2009). Fracciones orgánicas e inorgánicas del fósforo en suelos calcáreos de Villa Clara. *Centro agrícola*, 36(3), 29-33.
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*, 8, 971.
- Anand, K. U. M. A. R., Kumari, B., & Mallick, M. A. (2016). Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as biofertilizers. *J Pharm PharmSci*, 8, 37-40.
- Antoun, H. (2012). Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Engineering*, 46, 62-67.
- Anzuay, M. S., Ciancio, M. G. R., Ludueña, L. M., Angelini, J. G., Barros, G., Pastor, N., & Taurian, T. (2017). Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. *Microbiological research*, 199, 98-109.
- Aristizábal Gutiérrez, F. A., & Cerón Rincón, L. E. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Rev. colomb. biotecnol*, 14(1), 285-295.
- Arzuaga, S. A., López, C. F., Dalurzo, H. C., & Vazquez, S. (2005). Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa ácida, en entisoles, alfisoles y vertisoles de Corrientes con diferentes usos agrícolas. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Resumen A-066*. pp, 1-4.
- Ávila Martínez, E. G., Lizarazo Forero, L. M., & Cortés Pérez, F. (2015). Promoción

del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizósfera. *Acta Biológica Colombiana*, 20(3).

Awasthi, R., Tewari, R., y Nayyar, H. (2011). Sinergia entre plantas y microbios solubilizantes de P en suelos: efectos sobre el crecimiento y la fisiología de los cultivos. *Revista Internacional de Investigación de Microbiología*, 2 (12), 484-503.

Bakhshandeh, E., Rahimian, H., Pirdashti, H., & Nematzadeh, G. A. (2015). Evaluation of phosphate-solubilizing bacteria on the growth and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in northern Iran. *Journal of applied microbiology*, 119(5), 1371-1382

Basak, B. B., & Biswas, D. R. (2016). Potentiality of Indian rock phosphate as liming material in acid soil. *Geoderma*, 263, 104-109.

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.

Behera, B. C., Yadav, H., Singh, S. K., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Kumari, S., & Thatoi, H. (2017). Alkaline phosphatase activity of a phosphate solubilizing *Alcaligenes faecalis*, isolated from Mangrove soil. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 101-111.

Bhuyan, P. M., Sandilya, S. P., Nath, P. K., Gandotra, S., Subramanian, S., Kardong, D., & Gogoi, D. K. (2018). Optimization and characterization of extracellular cellulase produced by *Bacillus pumilus* MGB05 isolated from midgut of muga silkworm (*Antheraea assamensis* Helfer). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(4), 1171-1181.

Cáñez-Carrasco, M. G., & García-Alegría, A. M. (2015). Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible/validation of an analytical method for uv-visible spectrophotometric

phosphorus determination. *Biotechnia*, 17(1), 32-39.

Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41.

Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., & Sa, T. (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10), 1970-1974.

Cisneros, C. A., & Menjivar, J. C. (2017). Identification of phosphate solubilizing bacteria in a Andisol of Colombian coffee region. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 21-28. Cisneros-Rojas, C. A., Sánchez-de Prager, M., & Menjivar-Flores, J. C. (2017). Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 149-158.

Correa, A., & Oviedo, A. (2017). Estudio de un método para determinar fósforo en leguminosas mediante espectroscopía ultravioleta visible. *infoANALÍTICA*, 5(1), 53-66.

Coyne, M., & Rasskin, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*.

De Bradford, R. (1976). Determinacion De Proteinas: Metodo De Bradford.

Delfim, J., Schoebitz, M., Paulino, L., Hirzel, J., & Zagal, E. (2018). Phosphorus availability in wheat, in volcanic soils inoculated with phosphate-solubilizing *Bacillus thuringiensis*. *Sustainability*, 10(1), 144.

Dhillon, J., Torres, G., Driver, E., Figueiredo, B., & Raun, W. R. (2017). World phosphorus use efficiency in cereal crops. *Agronomy Journal*, 109(4), 1670-1677.

Dissanayaka, D. M. S. B., Plaxton, W. C., Lambers, H., Siebers, M., Marambe, B., & Wasaki, J. (2018). Molecular mechanisms underpinning phosphorus-use efficiency in rice. *Plant, cell & environment*, 41(7), 1483-1496.

- Dotaniya, M. L., Datta, S. C., Biswas, D. R., & Kumar, K. (2014). Effect of organic sources on phosphorus fractions and available phosphorus in TypicHaplustept. *J Indian Soc Soil Sci*, 62(1), 80-83.
- Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, L., Merbach, W., & Etoa, F. X. (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeisguineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 5(24).
- FAO. (2018). El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Fomentando la resiliencia climática en aras de la seguridad alimentaria y la nutrición.
- Filippelli, GM (2011). Formación de rocas de fosfato y geoquímica marina de fósforo: la perspectiva del tiempo profundo. *Quemosfera*, 84 (6), 759-766.
- Florido, G. M., Rondón, A. J., Pérez, M., Arteaga, F., Bocourt, R., Portilla, Y., ... & Laurencio, M. (2017). Methodology for the isolation, identification and selection of *Bacillus* spp. strains for the preparation of animal additives. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 51(2), 197-207.
- Fry, S. C. (2018). Cell wall polysaccharide composition and covalent crosslinking. *Annual Plant Reviews online*, 1-42.
- Garcia-Lopez, A. M., & Delgado, A. (2016). Effect of *Bacillus subtilis* on phosphorus uptake by cucumber as affected by iron oxides and the solubility of the phosphorus source. *Agricultural and Food Science*, 25(3), 216-224.
- Ghosh, S., Goswami, A. J., Ghosh, G. K., & Pramanik, P. (2018). Quantifying the relative role of phytase and phosphatase enzymes in phosphorus mineralization during vermicomposting of fibrous tea factory waste. *Ecological engineering*, 116, 97-103
- Gonzalez, F., Fárez-Vidal, M. E., Arias, J. M., & Montoya, E. (1994). Partial purification and biochemical properties of acid and alkaline phosphatases from *Myxococcus coraloides* D. *Journal of applied bacteriology*, 77(5), 567-

573.

Greiling, A. M., Tschesche, C., Baardsen, G., Kröckel, S., Koppe, W., & Rodehutschord, M. (2019). Effects of phosphate and phytase supplementation on phytate degradation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 503, 467-474.

Halder, AK, y Chakrabartty, PK (1993). Solubilización de fosfato inorgánico por *Rizobium*. *Folia microbiologica* , 38 (4), 325-330.

Hamim, A., Boukeskase, A., Ouhdouch, Y., Farrouki, A., Barrijal, S., Miché, L., ... & Hafidi, M. (2019). Phosphate solubilizing and PGR activities of ericaceous shrubs microorganisms isolated from Mediterranean forest soil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101128.

He, S., Kunin, V., Haynes, M., Martin, H. G., Ivanova, N., Rohwer, F., ... & McMahon, K. D. (2010). Metatranscriptomic array analysis of 'Candidatus *Accumulibacter phosphatis*'-enriched enhanced biological phosphorus removal sludge. *Environmental microbiology*, 12(5), 1205-1217.

Holford, ICR (1997). El fósforo del suelo: su medida y su absorción por las plantas. *Investigación de suelos* , 35 (2), 227-240.

Khan, M. S., Zaidi, A., & Musarrat, J. (2016). *Phosphate solubilizing microorganisms*. Springer International Pu.

Khoi, C. M., Guong, V. T., Drouillon, M., Pypers, P., & Merckx, R. (2008). Chemical estimation of phosphorus released from hypersaline pond sediments used for brine shrimp *Artemia franciscana* production in the Mekong Delta. *Aquaculture*, 274(2-4), 275-280.

KUMAR, A., & RAI, L. C. (2017). Soil organic carbon and availability of soil phosphorus regulate abundance of culturable phosphate solubilizing bacteria in paddy fields of the Indo-Gangetic Plain. *Pedosphere*.

Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Ramírez, L. C. C., & Leal, L. C. S. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en

cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*, 9(16), 177-187.

Linu, MS, Sreekumar, J., Asok, AK, y Jisha, MS (2018). Solubilización de fosfato mineral por aislados de *Pseudomonas aeruginosa* de los campos de chile (*Capsicum annuum* L.). *Diario de la agricultura tropical*, 55 (2), 134-144.

Logan, N. A., & Vos, P. D. (2015). *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-163.

López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, MF, Ramírez-Rodríguez, V., y Herrera-Estrella, L. (2000). Metabolismo del ácido orgánico en plantas: de la fisiología adaptativa a las variedades transgénicas para el cultivo en suelos extremos. *Plant Science*, 160 (1), 1-13.

Makoudi, B., Kabbadj, A., Mouradi, M., Amenc, L., Domergue, O., Blair, M., ... & Ghoulam, C. (2018). Phosphorus deficiency increases nodule phytase activity of faba bean–rhizobia symbiosis. *Acta physiologiae plantarum*, 40(3), 63.

Martínez-Viera, R., Dibut, B., & Yoania, R. (2010). Efecto de la integración de aplicaciones agrícolas de biofertilizantes y fertilizantes minerales sobre las relaciones suelo-planta. *Cultivos Tropicales*, 31(3), 00-00.

Menezes-Blackburn, D., Giles, C., Darch, T., George, TS, Blackwell, M., Stutter, M., ... y Brown, L. (2017). Oportunidades para movilizar el fósforo recalitrante de los suelos agrícolas: una revisión. *Planta y suelo*, 1-12.

Menezes-Blackburn, D., Inostroza, N. G., Gianfreda, L., Greiner, R., Mora, M. L., & Jorquera, M. A. (2016). Phytase-producing *Bacillus* sp. inoculation increases phosphorus availability in cattle manure. *Journal of soil science and plant nutrition*, 16(1), 200-210.

Mitchell, J. K., & Soga, K. (2005). Fundamentals of soil behavior. *Fundamentals of soil behavior.*, (Ed. 3).

Moharana, P. C., & Biswas, D. R. (2016). Assessment of maturity indices of rock phosphate enriched composts using variable crop residues. *Bioresource*

technology, 222, 1-13.

Morais, F. A., & Gatiboni, L. C. (2015). Phosphorus availability and microbial immobilization in a Nitisol with the application of mineral and organo-mineral fertilizers. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87(4), 2289-2299.

Moura, R. S., Martín, J. F., Martín, A., & Liras, P. (2001). Substrate analysis and molecular cloning of the extracellular alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus*. *Microbiology*, 147(6), 1525-1533.

Murphy, J. A. M. E. S., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.

Onthong, J., Gimsanguan, S., Pengnoo, A., Nilnond, C., & Osaki, M. (2007). Effect of pH and some cations on activity of acid phosphatase secreted from *Ustilago* sp. isolated from acid sulphate soil. *Songklanakarin J Sci Technol*, 29, 275-286.

Ordoñez, Y. M., Fernandez, B. R., Lara, L. S., Rodriguez, A., Uribe-Vélez, D., & Sanders, I. R. (2016). Bacteria with phosphate solubilizing capacity alter mycorrhizal fungal growth both inside and outside the root and in the presence of native microbial communities. *PloS one*, 11(6), e0154438.

Owens, L. B., & Shipitalo, M. J. (2015). Surface and subsurface phosphorus losses from fertilized pasture systems in Ohio. *Journal of Environmental Quality*, 35(4), 1101-1109.

Panda, B., Rahman, H., & Panda, J. (2016). Phosphate solubilizing bacteria from the acidic soils of Eastern Himalayan region and their antagonistic effect on fungal pathogens. *Rhizosphere*, 2, 62-71.

Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 379-391.

- Pandey, D., y Putatunda, C. (2018). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato de la rizosfera de la planta de papa. *En t. J. Curr. Microbiol. App. Sci* , 7 (01), 967-975.
- Pant, H. K., &Warman, P. R. (2000). Enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus by immobilized phosphatases. *Biology and Fertility of Soils*, 30(4), 306-311.
- Paul, D., & Sinha, S. N. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science*, 15(1), 130-136.
- Peñata, N., Luis, J., & Esquivel Avila, L. M. (2018). *Aislamiento, Identificación Y Evaluación De Cepas Nativas Solubilizadoras De Fosfato En Zona Rural De Montería Córdoba* (Doctoral dissertation).
- Pineda, M. E. B. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113.
- Ponmurugan, P., &Gopi, C. (2006). In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 5(4), 348-350.
- Qian, T., Yang, Q., Jun, D. C. F., Dong, F., & Zhou, Y. (2019). Transformation of phosphorus in sewage sludge biochar mediated by a phosphate-solubilizing microorganism. *Chemical Engineering Journal*, 359, 1573-1580.
- Qvirist, L., Carlsson, N. G., & Andlid, T. (2015). Assessing phytase activity—methods, definitions and pitfalls. *Journal of Biological Methods (JBM)*, 2(1).
- Rahman, R. N. Z. A., Geok, L. P., Basri, M., &Salleh, A. B. (2005). Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *Bioresource technology*, 96(4), 429-436.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., &Latif, F. (2004).Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak J BiolSci*, 7(2), 187-196.

- Rasoulnia, P., & Mousavi, S. M. (2016). Maximization of organic acids production by *Aspergillus niger* in a bubble column bioreactor for V and Ni recovery enhancement from power plant residual ash in spent-medium bioleaching experiments. *Bioresource technology*, 216, 729-736.
- Rasul, M., Yasmin, S., Zubair, M., Mahreen, N., Yousaf, S., Arif, M., ... & Mirza, M. S. (2019). Phosphate solubilizers as antagonists for bacterial leaf blight with improved rice growth in phosphorus deficit soil. *Biological Control*, 136, 103997.
- Rezakhani, L., Moteszarezhadeh, B., Tehrani, M. M., Etesami, H., & Hosseini, H. M. (2019). Phosphate-solubilizing bacteria and silicon synergistically augment phosphorus (P) uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) plant fertilized with soluble or insoluble P source. *Ecotoxicology and environmental safety*, 173, 504-513.
- Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant physiology*, 156(3), 989-996.
- Ridge, E. H., & Rovira, A. D. (1971). Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and nonsterile conditions. *New Phytologist*, 70(6), 1017-1026.
- Rittmann, B. E., Mayer, B., Westerhoff, P., & Edwards, M. (2011). Capturing the lost phosphorus. *Chemosphere*, 84(6), 846-853.
- Rocky-Salimi, K., Hashemi, M., Safari, M., & Mousivand, M. (2016). A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* BS 46. *Journal of advanced research*, 7(3), 381-390.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339.
- Rodríguez-Gómez, O., Aguilera-Rodríguez, I., & Pérez-Silva, R. M. (2013). Adecuación de un micrométodo colorimétrico para la cuantificación de fósforo soluble en cultivos microbianos. *Revista Cubana de Química*, 25(1).

- Romanyà, J., Blanco-Moreno, J. M., & Sans, F. X. (2017). Phosphorus mobilization in low-P arable soils may involve soil organic C depletion. *Soil Biology and Biochemistry*, 113, 250-259.
- Saeid, A., Prochownik, E., y Dobrowolska-Iwanek, J. (2018). Solubilización de fósforo por especies de Bacillus. *Moléculas*, 23 (11), 2897.
- Sahandi, M. S., Mehrafarin, A., Badi, H. N., Khalighi-Sigaroodi, F., & Sharifi, M. (2019). Improving growth, phytochemical, and antioxidant characteristics of peppermint by phosphate-solubilizing bacteria along with reducing phosphorus fertilizer use. *Industrial Crops and Products*, 141, 111777.
- Salleh, MAM, Mahmoud, DK, Karim, WAWA, e Idris, A. (2011). Adsorción de colorantes catiónicos y aniónicos por residuos agrícolas sólidos: una revisión exhaustiva. *Desalinización*, 280 (1-3), 1-13.
- Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E. U. B., Sadhana, B., & Vani, S. S. (2017). Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(4), 2133-2144.
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., ... y Zhang, F. (2011). Dinámica del fósforo: del suelo a la planta. *Fisiología vegetal*, 156 (3), 997-1005.
- Shin, D., Kim, J., Kim, B. S., Jeong, J., & Lee, J. C. (2015). Use of phosphate solubilizing bacteria to leach rare earth elements from monazite-bearing ore. *Minerals*, 5(2), 189-202.
- Solanki, M., Kundu, B. S., & Nehra, K. (2018). Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. *Annals of Agrarian Science*, 16(4), 458-463.
- Stevenson, F. J., & Cole, M. A. (1999). *Cycles of soils: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. John Wiley & Sons.
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil biology and biochemistry*, 1(4), 301-307.

- Ureña, P. C., & Beriguete, P. F. (2018). Efecto de reguladores de crecimiento, de *Trichoderma harzianum* y de elementos minerales sobre rebrotes de café (*Coffea arabica* L.) en Acosta, San José, Costa Rica. *Revista AgrolInnovación en el Trópico Húmedo*, 1(1), 3-9.
- Vaccari, D. A., & Strigul, N. (2011). Extrapolating phosphorus production to estimate resource reserves. *Chemosphere*, 84(6), 792-797.
- vanHaandel, L., Bremmer, G. M., Hensen, E. J. M., & Weber, T. (2017). The effect of organic additives and phosphoric acid on sulfidation and activity of (Co) Mo/Al₂O₃ hydrodesulfurization catalysts. *Journal of catalysis*, 351, 95-106.
- Wei, Y., Zhao, Y., Wang, H., Lu, Q., Cao, Z., Cui, H., ... & Wei, Z. (2016). An optimized regulating method for composting phosphorus fractions transformation based on biochar addition and phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource technology*, 221, 139-146.
- Withers, P. J., Elser, J. J., Hilton, J., Ohtake, H., Schipper, W. J., & Van Dijk, K. C. (2015). Greening the global phosphorus cycle: how green chemistry can help achieve planetary P sustainability. *Green Chemistry*, 17(4), 2087-2099.
- Wojtusik, M. W. (2018). *TESIS DOCTORAL Hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Wyciszkiwicz, M., Saeid, A., Dobrowolska-Iwanek, J., & Chojnacka, K. (2016). Utilization of microorganisms in the solubilization of low-quality phosphorus raw material. *Ecological Engineering*, 89, 109-113.
- Xiao, L., Huang, Y., Zeng, Q., Zhao, J., y Zhou, J. (2018). Actividades enzimáticas del suelo y respuesta de la biomasa microbiana a los tipos de cultivos en las terrazas de la meseta de Loess, China. *Revista de suelos y sedimentos*, 18(5), 1971-1980.
- Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G., y Ying-Xue, S. (2010). Efectos de diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo en el crecimiento, la absorción de nutrientes y la acumulación de lípidos de una microalga de agua dulce

Scenedesmus sp. *Tecnología Bioresource* , 101 (14), 5494-5500.

Yacumal Fernández, V. (2015). Aislamiento y caracterización de poblaciones bacterianas solubilizadoras de fosfatos en tres agroecosistemas del Valle del Cauca.

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.

Dirección General de Bibliotecas UPEL