

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Evaluación de la capacidad de solubilización de fósforo en
aislamientos bacterianos de suelo utilizado para cultivo de caña
de azúcar**

Trabajo de graduación presentado por
Xavier Andrés Flores Solares
para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2025

Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Evaluación de la capacidad de solubilización de fósforo en
aislamientos bacterianos de suelo utilizado para cultivo de caña
de azúcar**

Trabajo de graduación presentado por
Xavier Andrés Flores Solares
para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2025

Vo. Bo.



(f)

(Ph.D. Dalia Lau-Bonilla)

Tribunal examinador



(f)

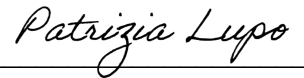
(Ph.D. Dalia Lau-Bonilla)

(f)



(M.Sc. Isabella García Caffaro)

(f)



(Ph.D. Patrizia Lupo)

Fecha de aprobación: Guatemala, 26 de enero de 2024.

PREFACIO

La presente investigación es parte de un proyecto llamado “Mejoramiento de salud de suelo de monocultivo a través de la optimización de procedimiento de compostaje y manejo de microbiología de suelos”, llevado a cabo por el Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) de la Universidad Del Valle de Guatemala en conjunto con Ingenio Magdalena S.A. El proyecto surge como una iniciativa para adoptar técnicas de agricultura sostenible aplicadas al cultivo de azúcar en Guatemala. Concretamente, esta investigación se enfoca en la solubilización biológica de fosfatos, un nutriente imprescindible para el desarrollo óptimo de los cultivos.

Quiero extender mi agradecimiento a la Dra. Dalia Lau-Bonilla y la M.Sc. Isabella García por su excelente orientación y apoyo durante todo el proceso. Su mentoría me ha ayudado mucho a crecer profesionalmente. Gracias por hacer lo que hacen, gracias por ayudarme a mí y gracias por ayudar a Guatemala.

Quisiera agradecer a mis profesores, MSc. Miguel Morales y Lic. Marie Cosenza quienes me han instruido, acompañado y guiado en mi formación profesional, gracias por contagiarme esta pasión por la ciencia ustedes son el tipo de profesor que necesita Guatemala.

También me gustaría agradecer a mis padres, Neftalí Flores y Elizabeth Solares por su apoyo incondicional durante mi carrera, tanto económico como emocional.

ÍNDICE

PREFACIO	iv
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	2
A. Principal.....	2
B. Específicos.....	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. FACTIBILIDAD DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
A. Recursos humanos.....	4
B. Recursos Financieros.....	4
V. MARCO TEÓRICO.....	5
A. El ciclo del fósforo	5
B. El rol del fósforo en la agricultura.....	6
C. Mineralización biológica del fósforo.....	7
D. Solubilización biológica de los fosfatos.....	8
E. Microorganismos solubilizadores de fosfatos.....	8

1. Mecanismos para la solubilización de fósforo	9
2. Secreción de ión amonio (NH ₄).....	10
3. Producción de ácidos orgánicos	10
4. Producción de enzimas extracelulares.....	10
5. Sideróforos.....	11
6. Moléculas señalizadoras	11
7. Producción de exopolisacáridos	11
F. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB).....	11
G. Regulón <i>Pho</i> y su rol en el metabolismo de fósforo	12
H. Genes <i>PhoD</i> , <i>PhoA</i> y <i>PhoX</i>	13
I. Agricultura sostenible	14
1. La problemática del uso excesivo de fertilizantes	14
2. La bioprospección orientada al sector agrícola	15
3. Enmiendas para el uso desmedido de fertilizantes	16
VI. METODOLOGÍA.....	18
A. Sitio de estudio	18
B. Sujetos de estudio	18
C. Enfoque, diseño y tipo de investigación.....	18
D. Tipo y tamaño de muestra	18
E. Estudios previos.....	19
F. Variables	19

G. Hipótesis.....	20
H. Materiales y métodos.....	21
VII. RESULTADOS.....	27
A. Identificación del aislamiento bacteriano con mayor índice de solubilización de fosfatos	27
B. Determinación de la cantidad de fosfato solubilizado.....	29
C. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina.	31
D. Detección de la presencia del gen regulador <i>PhoD</i>	32
VIII. DISCUSIÓN	34
IX. CONCLUSIONES.....	47
X. RECOMENDACIONES.....	48
XI. LITERATURA CITADA.....	49
XII. ANEXOS.....	57
Anexo 1. Datos de cepas bacterianas	57
Anexo 2. Curvas de calibración	60
Anexo 3. Procedimiento normado de operación.....	61
Anexo 4. Procedimiento normado de operación.....	67
Anexo 5. Procedimiento normado de operación.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo biogeoquímico del fósforo (Aulakh et al., 2008).	5
2. Mecanismos de solubilización de fósforo (Rawat et al., 2021).	9
3. Esquema de funcionamiento del complejo regulador <i>Pho</i> (Imagen propia).....	13
4. Diluciones seriadas (Modificado de Behera et al., 2017).	22
5. Aislamientos bacterianos inoculados en agar NBRIP con azul de bromotimol ...	28
6. Gráfico circular de proporciones de las cepas bacterianas agrupadas por género	29
7. Cantidad de fosfato solubilizado por la cepa bacteriana en 24 horas	30
8. Gráfico circular de proporciones de las cepas bacterianas agrupadas por género	30
9. Actividad enzimática presentada por la cepa bacteriana	31
10. Gráfico circular de proporciones de las cepas bacterianas agrupadas por género	32
11. Amplificación del gen regulador <i>PhoD</i> de las cepas bacterianas seleccionadas ..	32
12. Gráfico circular de proporciones de las cepas bacterianas agrupadas por presencia o ausencia del gen <i>PhoD</i>	33
13. Curva de calibración KH_2PO_4	60
14. Curva de calibración <i>P</i> -nitrofenol.....	61
15. Aspecto del halo de solubilización en medio NBRIP.....	66
16. Reactivo de Murphy y Riley	72

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Variables para la evaluación de la capacidad de solubilización de fósforo de cepas bacterianas aisladas de suelo.....	19
2. Reactivos para la amplificación del gen <i>PhoD</i> por PCR de colonia.....	25
3. Condiciones de amplificación de <i>PhoD</i>	26
4. Resultados de determinación del Índice de solubilización (SI) de las especies bacterianas.....	28
5. Cepas bacterianas de interés	33
6. Datos de todas las cepas bacterianas.....	57
7. Reactivo	81

RESUMEN

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB) son un grupo de bacterias presentes en el suelo que tienen la capacidad de solubilizar formas inorgánicas de fósforo, que no pueden ser absorbidas por las plantas. El fósforo, al ser un nutriente esencial para el crecimiento, es de vital importancia que se encuentre en el suelo en forma de especies químicas que sean accesibles para la planta.

Las PSB pueden ayudar a mejorar la disponibilidad de fosfatos en el suelo, lo que puede aumentar el rendimiento y la calidad de los cultivos. Las PSB también pueden reducir la necesidad de fertilizantes fosfatados, lo que supone avances clave para una agricultura sostenible y la mejora de la salud del suelo entendiendo la dinámica microbológica del mismo.

Para aplicar las PSB como una alternativa a los fertilizantes fosfatados es necesario comprender a profundidad las características de estas bacterias que las vuelven promotoras del crecimiento vegetal. El objetivo del presente estudio fue llevar a cabo una selección de cepas candidatas de PSB aisladas de suelo de cultivo de caña de azúcar para determinar los mecanismos moleculares que resultan en la solubilización de fosfatos, mediante técnicas bioquímicas y moleculares. Los resultados de la investigación asociaron a los géneros bacterianos *Acinetobacter*, *Leclercia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Lelliottia*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas* y *Bacillus* como bacterias solubilizadoras de fosfatos de la rizósfera de plantas de caña de azúcar en el departamento Escuintla de Guatemala.

Los cuatro experimentos realizados evidencian a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Bacillus* como posibles microorganismos para considerar en la formulación de un biofertilizante, ya que parecen ser particularmente eficientes en la solubilización de fosfatos tanto por medio de secreción de ácidos orgánicos como por medio de la secreción de enzimas extracelulares. Estos resultados respaldan el potencial de estos géneros bacterianos para ser considerados como potenciales para la formulación de un biofertilizante que sustituya el uso de fertilizantes químicos fosfatados, acercando a Guatemala a tener una agricultura más sostenible y limpia.

ABSTRACT

Phosphate-solubilizing bacteria (PSB) are a group of soil bacteria capable of solubilizing inorganic forms of phosphorus, which are otherwise inaccessible to plants. As phosphorus is a vital nutrient for plant growth, it is crucial that it be available in the soil in forms that plants can absorb. PSBs can enhance the availability of phosphates in the soil, potentially increasing crop yield and quality. They also reduce the need for phosphate fertilizers, representing a key advancement toward sustainable agriculture and improved soil health by understanding the microbiological dynamics of the soil.

To utilize PSBs as an alternative to phosphate fertilizers, it is necessary to understand the characteristics that make these bacteria effective plant growth promoters. This study aimed to select candidate PSB strains isolated from sugarcane cultivation soil to determine the molecular mechanisms resulting in phosphate solubilization using biochemical and molecular techniques. The results identified the bacterial genera *Acinetobacter*, *Leclercia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Lelliottia*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, and *Bacillus* as phosphate-solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane plants in the Escuintla department of Guatemala.

The four experiments conducted highlight the genera *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Bacillus* as potential microorganisms for consideration in biofertilizer formulation, as they appear particularly efficient in phosphate solubilization through the secretion of organic acids and extracellular enzymes. These findings support the potential of these bacterial genera for the development of a biofertilizer to replace chemical phosphate fertilizers, moving Guatemala closer to achieving more sustainable and cleaner agriculture.

I. INTRODUCCIÓN

La biodisponibilidad de nutrientes para los cultivos en los suelos es esencial para su desarrollo óptimo. Por lo tanto, la industria agrícola ha optado por suplementar los suelos con fertilizantes químicos que incluyen fósforo y nitrógeno, entre otros nutrientes para favorecer el crecimiento de los cultivos (Malhotra *et al.*, 2018). Los fertilizantes químicos suplen las necesidades nutricionales de los cultivos, pero traen consigo varios problemas a largo plazo si se usan de forma desmedida. Entre los principales problemas suele existir contaminación de cuerpos de agua, degradación de suelo, dependencia por parte de los agricultores, emisiones de gases de efecto invernadero, entre otros (Savci, 2012).

Los biofertilizantes o fertilizantes biológicos representan una alternativa biotecnológica para mitigar el uso desmedido de fertilizantes químicos. Algunos microorganismos hacen que los nutrientes ya presentes en el suelo, debido a los fertilizantes químicos, vuelvan a ser disponibles para las plantas por medio de su metabolismo (Sharma y Sharma, 2020).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar y cuantificar la capacidad de solubilización de fósforo de 110 aislamientos bacterianos de suelo, con el enfoque de identificar las bacterias que pueden ser utilizadas en el futuro como biofertilizantes para suplir la necesidad de fósforo de los cultivos en lugar de acudir a los fertilizantes químicos (Sharma y Sharma, 2020).

II. OBJETIVOS

A. Principal

Evaluar la capacidad de solubilización de fósforo de 110 aislamientos bacterianos de suelo utilizado para el cultivo de caña de azúcar.

B. Específicos

- Determinar la capacidad de las bacterias para solubilizar fosfato tricálcico en medios de cultivo enriquecidos.
- Establecer la cantidad de fosfato solubilizado por medio de espectrofotometría
- Determinar la actividad de la enzima fosfatasa en las bacterias solubilizadoras de fosfato.
- Detectar la presencia del gen regulador *phoD* en el genoma de las bacterias seleccionadas.

III. JUSTIFICACIÓN

Los recursos naturales son esenciales para el desarrollo sostenible de la agricultura y la seguridad alimentaria en un mundo con una población demográfica en constante crecimiento. Uno de los elementos clave para satisfacer la demanda de productos agrícolas es la optimización de los procesos de cultivo. Para ello se necesita comprender como funciona la nutrición de las plantas y cómo podemos mejorar su proceso de crecimiento. El fósforo es un nutriente esencial que a menudo es limitado en los suelos, los microorganismos solubilizadores de fósforo han surgido como una solución prometedora para aumentar la disponibilidad de este nutriente para las plantas, contribuyendo a una agricultura más eficiente y sostenible.

La investigación y estudio de microorganismos solubilizadores de fósforo representan un paso importante para la aplicación de prácticas agrícolas más sostenibles y consideradas con el medio ambiente. Al utilizar estos microorganismos como biofertilizantes, se puede aumentar la disponibilidad de fósforo en los suelos, mejorar la productividad de los cultivos y reducir los impactos negativos de la agricultura convencional. La inversión en la investigación e implementación de estas soluciones puede conducir a un futuro más saludable y equilibrado para la agricultura y la biósfera.

IV. FACTIBILIDAD DE LA INVESTIGACIÓN

A. Recursos humanos

- El investigador principal fue Xavier Andrés Flores Solares, con asesoría de PhD. Dalia Lau-Bonilla.

B. Recursos Financieros

- El financiamiento de la investigación estuvo a cargo de Ingenio Magdalena, S.A., como parte del proyecto “Mejoramiento de la salud del suelo de monocultivo a través de la optimización de procedimientos de compostaje y manejo de microbiología de suelos”.

V. MARCO TEÓRICO

A. El ciclo del fósforo

El fósforo es considerado un elemento necesario para sustentar la vida, ya que está presente en las células mayoritariamente en los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y en los fosfolípidos de la membrana celular (Fageria et al., 2008). El ciclo biogeoquímico del fósforo describe el movimiento de este elemento a través de distintos componentes del ecosistema, los cuales incluyen: la tierra, el agua, bacterias fijadoras, bacterias mineralizadoras, plantas y animales (Filippelli, 2002).

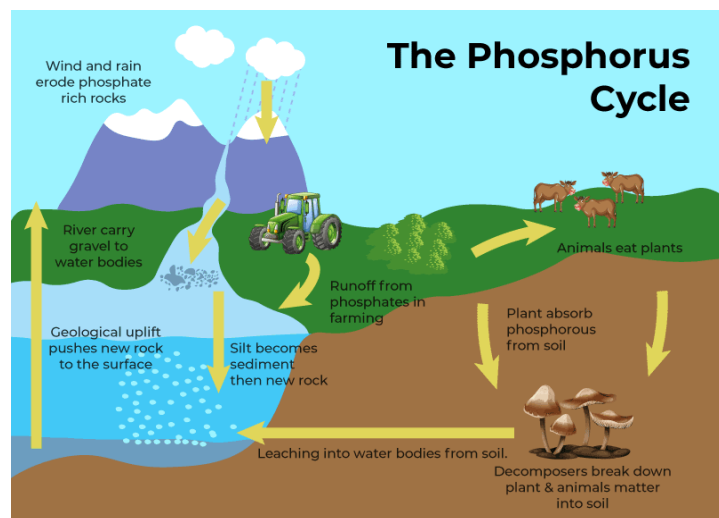


Figura 1: Ciclo biogeoquímico del fósforo (Aulakh et al., 2008).

El ciclo biogeoquímico del fósforo comienza con fósforo en el suelo producto de la erosión de las rocas y factores climáticos. El fósforo mineralizado luego debe ser solubilizado por bacterias solubilizadoras de fosfatos presentes en el suelo, para ser absorbido por las plantas a través de sus raíces. Las plantas utilizan el fósforo solubilizado

para desarrollar sus estructuras celulares y llevar a cabo procesos fisiológicos como la fotosíntesis (Filippelli, 2002).

El ciclo continúa con los animales herbívoros, cuando estos animales ingieren las plantas también absorben el fósforo. El fósforo se mueve en la red trófica entre animales herbívoros y carnívoros, hasta que dichos animales mueren. Los organismos muertos y desechos animales liberan el fósforo al suelo nuevamente donde puede volver a ser solubilizado por bacterias para estar biodisponible para las plantas (Aulakh et al., 2008).

Respecto al fósforo en los cuerpos de agua, puede llegar a ellos a través de la escorrentía del suelo y erosión de las rocas, donde es aprovechado por plantas y microorganismos acuáticos de vida libre (Filippelli, 2002). Cuando estos animales mueren el fósforo se deposita en el fondo del cuerpo de agua donde puede ser mineralizado en las rocas para repetir el ciclo (Filippelli, 2002).

B. El rol del fósforo en la agricultura

Debido a que el fósforo es esencial para el buen desarrollo de las plantas juega un papel importante en la agricultura. El fósforo es uno de los macronutrientes más importantes junto con el nitrógeno, son necesarios para que los cultivos puedan crecer y desarrollarse adecuadamente (Fageria y Baligar, 2008).

El fósforo es esencial para varios procesos bioquímicos de las plantas, la principal siendo la fotosíntesis. Durante este proceso la planta convierte la energía lumínica proveniente del sol en energía química, esencial para su crecimiento y desarrollo (Sánchez, 2021).

Algunos ejemplos de cultivos que se benefician en gran medida del fósforo incluyen al tomate, maíz, arroz, papas, cítricos, naranja, frijoles entre otros. La carencia de este

nutriente puede resultar en plantas débiles, una menor producción de frutos, y disminución en la salud del suelo afectando la calidad de la cosecha (Bollag, 2010).

En la agricultura el fósforo se encuentra naturalmente en el suelo, sin embargo, debe estar solubilizado para que esté disponible para la planta (Kumar *et al.*, sf.). Por lo tanto, los agricultores a menudo utilizan fertilizantes ricos en fósforo para mejorar la producción y garantizar la buena nutrición de sus cultivos (Doolette et al., 2015).

C. Mineralización biológica del fósforo

La biomineralización o mineralización biológica es un proceso metabólico presente generalmente en bacterias de suelo que conlleva la precipitación de minerales. En el caso del fósforo, se libera al suelo luego de que ciertos microorganismos descompongan la materia orgánica en su alrededor (Oehl et al., 2004). Las bacterias mineralizadoras de fósforo juegan un papel crucial en la biodisponibilidad de fósforo para las plantas, ya que mineralizan el fósforo añadido en fertilizantes en formas orgánicas complejas no asimilables para la planta producto de su metabolismo.

De forma que el 95 % del fósforo añadido a los suelos por medio de fertilizantes es rápidamente mineralizado en formas orgánicas complejas como la hidroxiapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, fosfato férrico (FePO_4) y fosfato de aluminio AlPO_4 y no está disponible para el uso de la planta (Oehl *et al.*, 2004). Los agricultores optan con cada cosecha nueva, volver a enriquecer el suelo con fertilizantes ricos en fósforo cuando realmente el suelo ya tiene fósforo de sobra, sin embargo, no es accesible para la planta.

D. Solubilización biológica de los fosfatos

La biosolubilización o solubilización biológica es un proceso metabólico presente en diversos microorganismos que conlleva la conversión de compuestos químicos en formas minerales a formas solubles en agua (Zaidi *et al.*, 2009). Este proceso es importante porque la mayoría de suelos contienen fósforo en forma de compuestos insolubles que no puede ser utilizados por la planta. La solubilización biológica se produce cuando los microorganismos, generalmente bacterias u hongos, producen enzimas que disuelven los compuestos insolubles de fósforo en el suelo. Estos microorganismos secretan ácidos orgánicos como ácido cítrico, ácido acético y ácido oxálico, que permiten disolver los fosfatos insolubles. Ya que las plantas necesitan que el fósforo esté en formas solubles para llevar a cabo sus funciones metabólicas (Zaidi *et al.*, 2009).

Actualmente existen investigaciones agrícolas orientadas a los microorganismos solubilizadores, ya que son de vital importancia para la accesibilidad de fósforo para las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999).

E. Microorganismos solubilizadores de fosfatos

Algunas bacterias cercanas a las raíces de las plantas pueden solubilizar fósforo haciéndolo disponible para el aprovechamiento de la planta. Estudios anteriores hechos en rizósfera de bambú en Tailandia reportan haber encontrado los siguientes géneros *Buttiauxella*, *Enterobacter*, *Burkholderia* (Ruangsanka, 2014).

Antecedentes americanos reportan bacterias rizosféricas de los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Streptomyces* y *Serratia* en cultivos de maíz y tomate (Billah *et al.*, 2019).

Además de su impacto en la nutrición óptima de las plantas, los microorganismos solubilizadores de fósforo también desempeñan un rol clave en la biodiversidad microbiana de suelo y en el mejoramiento de la salud de suelo. Esto conduce a un ecosistema de suelo más equilibrado y apto para cultivos, lo que reduce la necesidad de fertilizantes químicos y otros insumos agrícolas que dañan la salud del suelo a largo plazo. Identificando las bacterias presentes en la rizósfera de los cultivos tenemos acceso a la información para crear consorcios bacterianos que optimicen la disponibilidad de fósforo en el suelo para aplicarlo como alternativas para alcanzar una agricultura sostenible (Billah et al., 2019).

1. Mecanismos para la solubilización de fósforo

La literatura ha caracterizado hasta la fecha cinco mecanismos para la solubilización de fósforo en las simbiosis de las PGPBs, ya que la solubilización del fósforo puede ser producto de diversos procesos fisiológicos de las bacterias.

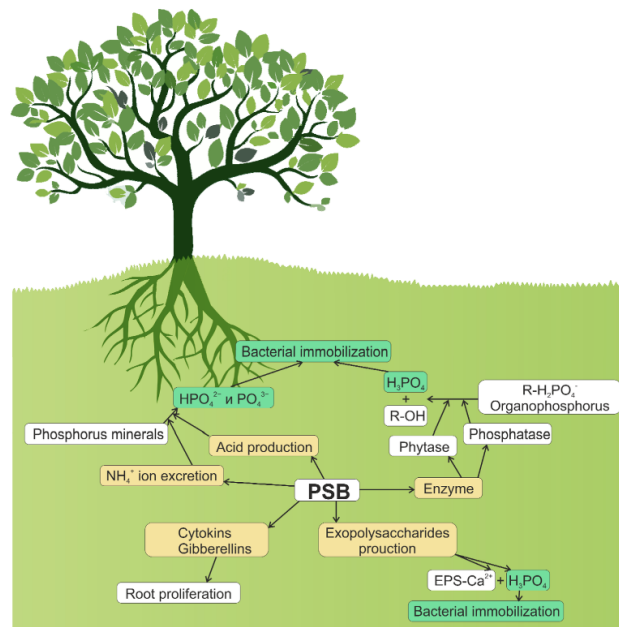


Figura 2: Mecanismos de solubilización de fósforo (Rawat et al., 2021).

En la figura anterior se muestran esquemáticamente los mecanismos de solubilización de fósforo asociados a las bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB). A continuación, se detalla cada uno de ellos:

2. Secreción de ión amonio (NH_4)

Las bacterias secretan compuestos amoniados al medio, rápidamente se disocian para dar paso al ión amonio (NH_4). Este ión puede solubilizar fosfatos al formar un complejo con ellos. El complejo amonio-fosfato que es más soluble que las formas inorgánicas de fósforo (Rawat et al., 2021). Estos complejos amonio-fosfato son asimilables para una gran cantidad de especies de plantas.

3. Producción de ácidos orgánicos

Las bacterias y algunos hongos solubilizadores de fósforo secretan ácidos orgánicos, como el ácido cítrico, ácido málico y ácido acético. Estos ácidos tienen la capacidad de liberar el fósforo presente en los compuestos insolubles en el suelo, convirtiéndolos en formas solubles y disponibles para las plantas al alterar el pH del medio (Rawat et al., 2021).

4. Producción de enzimas extracelulares

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos pueden segregar enzimas al medio extracelular como la fosfatasa ácida y la fosfatasa alcalina, estas enzimas descomponen los compuestos de fósforo orgánico e inorgánico presente en el suelo. Las enzimas catalizan reacciones que liberan fósforo de forma soluble y por lo tanto accesible para la planta (Rawat et al., 2021).

5. Sideróforos

Algunas bacterias producen sideróforos, compuestos orgánicos que se unen al fósforo en complejos y lo hacen más soluble en el suelo. Los sideróforos también pueden ayudar a transportar el fósforo hacia las raíces de las plantas (Rawat et al., 2021).

6. Moléculas señalizadoras

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos pueden liberar moléculas señalizadoras al medio, generalmente estas moléculas se asocian a la proliferación de las raíces de las plantas lo que desemboca en una mayor accesibilidad a los nutrientes de suelo. Algunas bacterias llegan a ser endófitas, es decir a habitar dentro de los tejidos de las plantas y a proveerles nutrientes necesarios para su nutrición (Hinsiger, 2001).

7. Producción de exopolisacáridos

Los exopolisacáridos secretados por las bacterias crean una red de macromoléculas que terminan por formar un “biofilm” una estructura de inmovilización bacteriana que le confiere ventajas a las bacterias/microorganismos que lo forman, entre ellas se crea un microambiente óptimo para el intercambio de sustancias entre las raíces de la planta y la comunidad bacteriana que conforma el biofilm, en algunos casos esas sustancias son formas químicas fosfatadas asimilables para la planta (López y Kolter, 2010).

F. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB)

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) por sus siglas en inglés son microorganismos presentes en el suelo que mantienen una estrecha asociación con las plantas. La literatura ha caracterizado esta relación como una simbiosis en la que ambas partes de la asociación obtienen beneficios, las bacterias obtienen carbohidratos producto

del metabolismo autótrofo de las plantas al igual que un ambiente protegido de depredadores y competencia con otras bacterias (Olanrewaju y Babalola, 2017).

Las plantas pueden beneficiarse de esta relación por medio del metabolismo de las bacterias, algunas bacterias pueden fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fósforo, producir fitohormonas etc. Las PGPB han demostrado ser una de las tecnologías con mayor potencial para alcanzar la agricultura sostenible ya que no dependen de la adición de fertilizantes químicos para suplir las necesidades nutricionales de las plantas y no contaminan el medio ambiente en el largo plazo (Glick, 2012). Por lo que es necesario considerar las PGPB para alternativas biotecnológicas a la adición de fertilizantes químicos en países con potencial agrícola.

G. Regulón *Pho* y su rol en el metabolismo de fósforo

El término “regulón” se refiere a un grupo de genes que están regulados de forma conjunta. Los genes de un regulón suelen estar implicados en la misma función o proceso metabólico. En el caso de las bacterias, se agrupan en unidades transcripcionales que contienen varios genes que se transcriben en una sola molécula de ARNm (Santos-Beneit, 2015).

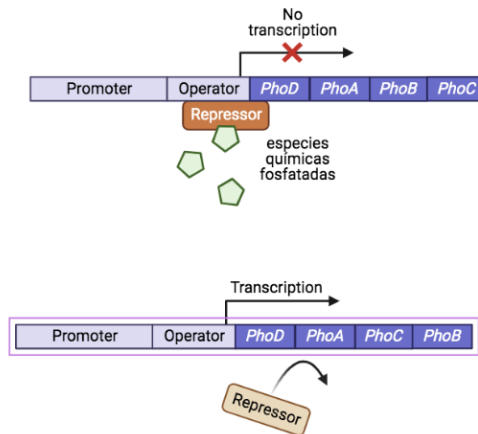


Figura 3: Esquema de funcionamiento del complejo regulador *Pho* (Imagen propia).

El regulón *Pho* es un operón inducible que regula la expresión de genes implicados en el metabolismo, transporte y almacenamiento de fósforo en bacterias. El regulón *Pho* está controlado por un gen regulador llamado *PhoR* que codifica una proteína represora.

La proteína *PhoR* se une a una secuencia del ADN llamada caja *Pho*, que se encuentra en el promotor de los genes regulados involucrados en el metabolismo del fósforo. En la presencia de fosfato inorgánico la proteína *PhoR* se fosforila, lo que provoca un cambio conformacional y hace que pierda su capacidad de unirse a la caja *Pho* (Santos-Beneit, 2015). El siguiente paso en la activación del sistema *Pho* es la transcripción de los genes relacionados al metabolismo del fósforo donde se pueden encontrar genes involucrados en estos procesos moleculares (Wanner y Chang, 1987).

H. Genes *PhoD*, *PhoA* y *PhoX*

Los genes *PhoD*, *PhoA* y *PhoX* son genes que codifican enzimas relacionadas al metabolismo del fósforo. Generalmente Las enzimas de solubilización de fósforo pertenecen a las fosfatasas alcalinas que catalizan la hidrólisis de fosfatos. Se ha

caracterizado que microorganismos solubilizadores de fosfatos contienen por lo menos uno de estos genes y que solo el 32 por ciento de los genomas bacterianos existentes los contienen (Fraser et al., 2015). A pesar que los tres genes codifican enzimas fosfatasas que hidrolizan los fosfatos inorgánicos para transformarlos en fosfatos orgánicos, se ha caracterizado que el gen *PhoD* es en proporción el más común, además que se ha correlacionado la expresión del gen *PhoD* con la concentración de fósforo en los suelos.

I. Agricultura sostenible

La agricultura sostenible se basa en un enfoque integral y equilibrado para cultivar alimentos y otros productos agrícolas, se busca maximizar la producción de manera responsable con los recursos naturales y el medio ambiente. Su objetivo es garantizar la disponibilidad de alimentos y recursos para satisfacer las necesidades de la sociedad y considerar los intereses de las generaciones futuras, sin agotar ni degradar recursos como el suelo, el agua y la biodiversidad (Velten, et al., 2015).

En la agricultura sostenible, se buscan métodos y prácticas que reduzcan al mínimo los impactos negativos al medio ambiente, al mismo tiempo que se promueve la salud del suelo y de los ecosistemas circundantes. Para ello es necesaria la adopción de técnicas de manejo agronómico que conserven la salud del suelo, como la rotación de cultivos, uso de fertilizantes orgánicos, y el uso de microorganismos como promotores de salud de suelo (Velten, et al., 2015).

1. La problemática del uso excesivo de fertilizantes

El uso excesivo de fertilizantes ricos en fósforo por parte de los agricultores puede perjudicar significativamente el medio ambiente, Cuando se aplican grandes cantidades de fertilizantes ricos en fósforo en el suelo, parte del fósforo puede quedar retenido en el suelo

y no ser utilizado por las plantas. Este fósforo residual puede ser arrastrado por el agua de lluvia o el riego y terminar en ríos, lagos y acuíferos cercanos (Savci, 2012).

El exceso de fósforo en los cuerpos de agua puede causar eutrofización, un proceso en el que se produce un crecimiento excesivo de algas y plantas acuáticas que consume el oxígeno del agua y puede causar la muerte de la vida acuática (Fontúrbel Rada, 2005).

Además, el uso excesivo de fertilizantes ricos en fósforo puede afectar la calidad del suelo al aumentar el pH del suelo y disminuir la biodiversidad microbiana, lo que puede afectar la capacidad del suelo para retener agua y nutrientes, así como la salud y productividad de los cultivos (Savci, 2012). Además, el exceso de fósforo en el suelo puede reducir la absorción de otros nutrientes por las plantas, lo que puede afectar negativamente su crecimiento y producción.

Por lo tanto, es importante que los agricultores apliquen fertilizantes ricos en fósforo con cuidado y sigan las recomendaciones de aplicación adecuada de acuerdo con las necesidades de las plantas y la calidad del suelo (Savci, 2012).

2. La bioprospección orientada al sector agrícola

La bioprospección es un proceso en el cual se busca, descubre y desarrolla nuevos recursos biológicos, generalmente aplicados a microorganismos con el fin de utilizarlos en aplicaciones que atiendan necesidades humanas (Cruz et al., 2022). La bioprospección implica explorar la biodiversidad para encontrar soluciones innovadoras y sostenibles a desafíos en diversos campos.

Esta práctica se centra en explorar la biodiversidad en el entorno para encontrar soluciones innovadoras y sostenibles, la mejora de cultivos es una de las áreas clave donde la bioprospección ha demostrado un gran potencial (Srivastava *et al.*, 2022). Al explorar

los microorganismos presentes en los suelos se han descubierto bacterias, hongos y arqueas capaces de promover el crecimiento de las plantas, aumentar su resistencia a plagas y enfermedades y mejorar su nutrición (Singh et al., 2022).

Además, la bioprospección también contribuye a abordar los desafíos de estrés abiótico en los cultivos. Al explorar los microorganismos y genes específicos presentes en ciertos cultivos se pueden identificar mecanismos que permiten a las plantas resistir condiciones adversas como sequías, altas temperaturas o exceso de fertilizantes químicos en el suelo. Este enfoque permite la posibilidad de tener cultivos más resistentes y adaptamos a cambios climáticos asegurando una cosecha a pesar de las condiciones adversas (Cruz et al., 2022).

3. Enmiendas para el uso desmedido de fertilizantes

La agricultura moderna ha experimentado avances significativos que han aumentado la producción de alimentos y permitido alimentar a una creciente población global. Sin embargo, este progreso no ha estado exento de desafíos ambientales. Uno de los problemas latentes en la agricultura moderna es el uso desmedido de fertilizantes químicos, que ha llevado a la contaminación de suelo y agua, comprometiendo la sostenibilidad en el largo plazo (Savci, 2012).

El uso excesivo de fertilizantes químicos ha llevado a una serie de impactos negativos en el medio ambiente y en la salud humana. Los fertilizantes ricos en fósforo pueden lixiviar hacia aguas subterráneas y superficiales, causando la proliferación de algas que daña la salud de los cuerpos de agua. Además, contribuyen a la emisión de gases de efecto invernadero y la acidificación del suelo. La acumulación de residuos químicos en

los cultivos y la red trófica también representan riesgos para la salud humana (Fontúrbel Rada, 2005).

Dado el problema latente que representa el uso desmedido de fertilizantes químicos existen enmiendas para disminuir su uso las cuales incluyen:

- Fertilización balanceada; se basa en promover prácticas de fertilización que consideren la salud del suelo y las necesidades del cultivo. El uso de dosis adecuadas de nutrientes según los requerimientos de las plantas para reducir la aplicación excesiva de fertilizantes.
- Biofertilizantes y compostaje; se exploran alternativas sostenibles como los fertilizantes basados en microorganismos, y el compostaje que aportan nutrientes y materia orgánica al suelo para mejorar la salud del suelo y la diversidad microbiana, de forma que se disminuye la dependencia de fertilizantes químicos.
- Rotación de cultivos; al fomentar la rotación de cultivos y la siembra de cultivos de cobertura, se ayuda a mejorar la salud del suelo, se aumenta la biodiversidad y las cosechas son constantes. El ecosistema es más resiliente y se reduce la dependencia de fertilizantes químicos.

VI. METODOLOGÍA

A. Sitio de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en la ciudad de Guatemala, Guatemala en las instalaciones de la Universidad Del Valle de Guatemala: Laboratorio de Bioquímica y Microbiología.

B. Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio son aislamientos bacterianos de suelo utilizado para el cultivo de caña de azúcar de los géneros *Bacillus*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* solubilizadoras de fosfatos obtenidas del departamento de Escuintla Guatemala.

C. Enfoque, diseño y tipo de investigación

El enfoque de esta investigación es investigación básica siendo investigación cualitativa y cuantitativa con un diseño experimental verdadero.

D. Tipo y tamaño de muestra

Se utilizaron 110 bacterias aisladas del suelo seleccionadas de manera discreta, se seleccionaron 52 aislamientos debido a su efectividad en la solubilización de fosfatos.

E. Estudios previos

Este proyecto conjunto de la Universidad Del Valle de Guatemala y el Ingenio Magdalena comenzó en el año 2021. Bajo este proyecto se realizó un estudio que dio lugar al presente estudio. Titulado “Planteamiento de formulación de biofertilizantes bacterianos partiendo de cepas promotoras del crecimiento aisladas de suelos para cultivo de caña de azúcar en la costa sur de Guatemala”. En este primer estudio se aislaron distintas cepas bacterianas del suelo y se comprobaron distintas características metabólicas, entre ellas la solubilización de fósforo.

F. Variables

En el cuadro No. 1 se describen las variables consideradas en este estudio que tienen un efecto en la capacidad de solubilización de fósforo de las cepas bacterianas.

Cuadro 1: Variables para la evaluación de la capacidad de solubilización de fósforo de cepas bacterianas aisladas de suelo

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medición
Índice de solubilización	Relación entre el halo de solubilización en medio NBRIP y el tamaño de la colonia bacteriana.	Cuantitativo	-
Cantidad de Fósforo solubilizado	Fosfato solubilizado por la cepa bacteriana	Cuantitativo	mg/L
Gen <i>phoD</i>	Presencia del gen <i>phoD</i> indica la presencia de la enzima alcalina fosfatasa D.	Cualitativo	-

Actividad Fosfatasa alcalina	La tasa de actividad enzimática de fosfatasa alcalina	Cuantitativo	nmol/min
------------------------------	---	--------------	----------

Fuente: Elaboración propia.

G. Hipótesis

Objetivo 1

- Hipótesis nula 1
 - Los aislamientos bacterianos provenientes de suelo no poseen la capacidad de solubilizar fosfatos.
- Hipótesis alternativa 1
 - Los aislamientos bacterianos provenientes de suelo sí poseen la capacidad de solubilizar fosfatos.

Objetivo 2

- Hipótesis nula 2
 - Las cepas bacterianas no son capaces de segregar ácidos orgánicos que solubilizan el fosfato tricálcico en medios de cultivo NBRIP.
- Hipótesis alternativa 2
 - Las cepas bacterianas sí son capaces de segregar ácidos orgánicos que solubilizan el fosfato tricálcico en medios de cultivo NBRIP.

Objetivo 3

- Hipótesis nula 3

- Las cepas bacterianas no solubilizan el fósforo lo suficiente como para ser cuantificado por espectrofotometría.
- Hipótesis alternativa 3
 - Las cepas bacterianas sí solubilizan el fósforo lo suficiente como para ser cuantificado por espectrofotometría.

Objetivo 4

- Hipótesis nula 4
 - Las cepas bacterianas no secretan fosfatasa alcalina, por lo tanto, no hay actividad fosfatasa.
- Hipótesis alternativa 4
 - Las cepas bacterianas sí secretan fosfatasa alcalina, por lo tanto, sí hay actividad fosfatasa.

Objetivo 5

- Hipótesis nula 5
 - Las cepas bacterianas no presentan el gen *phoD*.
- Hipótesis alternativa 5:
 - Las cepas bacterianas sí presentan el gen *phoD*.

H. Materiales y métodos

1. Muestreo de suelos

- 1.1 Con una pala pequeña esterilizada se colectaron muestras de tierra a 10 - 15 cm de distancia de la base del tallo y a 10 – 15 cm de profundidad.
- 1.2 Se tomaron 10 g de tierra y se colocaron en una bolsa de muestreo.

- 1.3 Se muestreo de 4 a 5 puntos y se unificaron las muestras en la bolsa hermética.
- 1.4 Sellar la bolsa herméticamente.
- 1.5 Colocar la bolsa en una hielera y transportar con hielo.

2. Diluciones seriadas

- 2.1 Suspender 0.1 g de tierra en 900 uL de PBS a 20 mM con pH 7.4
- 2.2 Incubar por 1 hora a 130 rpm en incubadora con agitador orbital.
- 2.3 Después de la agitación realizar diluciones seriadas hasta 10^{-10} (como se indica en la figura 4)

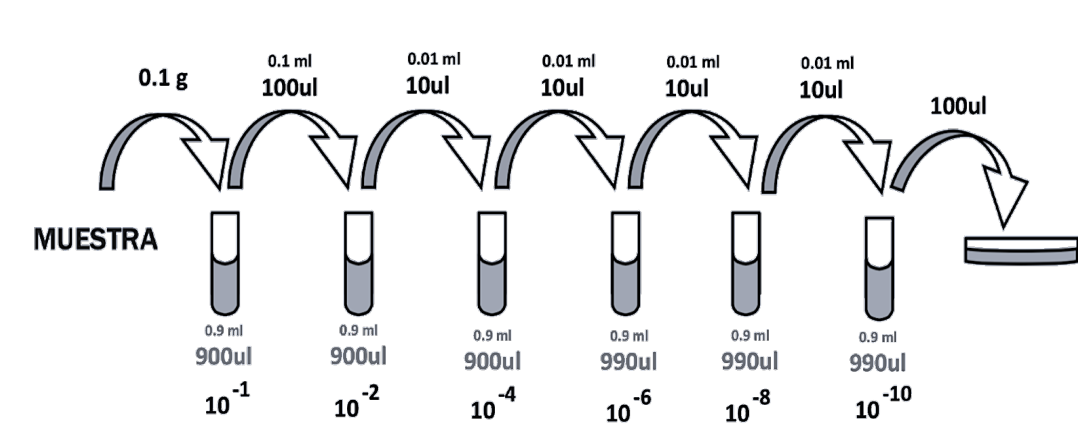


Figura 4: Diluciones seriadas (Modificado de Behera et al., 2017).

3. Inoculación en agar nutritivo.

- 3.1 Se agrega a 1 L de agua destilada los siguientes componentes, con agitación y calor constantes.
 - 5 g peptona
 - 3 g extracto de levadura
 - 8 g cloruro de sodio (NaCl)
 - 15 g agar grado bacteriológico
- 3.2 Con el medio esterilizado, inocular 100uL de cada dilución en agar nutritivo.
- 3.3 Incubar a temperatura ambiente por 7 días.

4. Obtención de cultivos puros

- 4.1 Con un palillo de madera estéril frotar la superficie del medio e introducir el palillo en un tubo cónico de 0.5 mL con agua peptonada.
- 4.2 Dejar toda la noche en agitación constante a temperatura ambiente.
- 4.3 Inocular 10 uL del agua peptonada en medios de agar nutritivo.
- 4.4 Estriar para obtención de colonias aisladas.
- 4.5 Incubar a temperatura ambiente por 7 días.

5. Inoculación en caldo nutritivo.

- 5.1 Se agrega a 1 L de agua destilada los siguientes componentes, con agitación y calor constantes.
 - 5 g Peptona
 - 3 g Extracto de levadura
 - 8 g Cloruro de sodio (NaCl)
- 5.2 Con el medio esterilizado servir 500 uL en tubos cónicos de 0.5 mL.
- 5.3 Con un palillo de madera estéril tomar una colonia e inocularla en tubo cónico de 0.5 mL con caldo nutritivo.
- 5.4 Incubar a 37° C por 24 horas.

6. Inoculación en medio NBRIP

- 6.1 Se agrega a 1 L de agua destilada los siguientes componentes, con agitación y calor constantes.
 - 10 g Glucosa
 - 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
 - 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- 0.2 g KCl
- 0.1 g (NH₄)₂SO₄
- 15 g Agar

6.2 Con el medio esterilizado, inocular 10 uL en el centro del medio NBRIP.

6.3 Incubar a temperatura ambiente durante 7 días.

6.4 Medir halo de solubilización.

6.5 Determinar el índice de solubilización con ecuación.

7. Determinación de la cantidad de fosfato solubilizado

En este estudio se siguió el procedimiento de determinación de la cantidad de fósforo solubilizado de (Murphy y Riley, 1962). Brevemente se realizó un cultivo bacteriano en medio líquido NBRIP, luego de 24 horas en incubación a 37 °C, utilizando una curva de calibración de fosfato de potasio dibásico (KH₂PO₄) se mide la densidad óptica a 882 nm.

8. Determinación de la actividad fosfatasa

En este estudio se siguió el procedimiento de la determinación de la actividad fosfatasa de (Behera et al., 2017). Brevemente se realiza un cultivo bacteriano en medio NBRIP y se incuban a 37 °C por 192 horas, se centrifuga y 1 ml de sobrenadante se mezcla con 4 mL de MUB y 1mL de p-nitrophenyl phosphate, se agrega una gota de tolueno y se deja incubar por 1 hora. Se mide la cantidad de p-nitrofenol midiendo la densidad óptica a 410 nm. Utilizando una curva estándar de p-nitrofenol con concentraciones conocidas de 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150 y 200 nmol/mL.

9. Detección del gen *phoD*

En este estudio se siguió el procedimiento de la determinación de la presencia del gen *phoD* de (Lang et al., 2021). Brevemente se realizará un PCR colony con buffer para PCR Colorless Gotaq Buffer y los primers ALPS-F730 (5'-CAGTGGGACGACCACGAGGT-3') y ALPS-1101 (5'-GAGGCCGATCGGCATGTCG-3') (Kiprotich et al., 2023). Luego se realiza la electroforesis en gel de agarosa 2 % a 100 V durante 30 min. El tamaño de banda esperado es de 371 bp.

Cuadro 2. Reactivos para la amplificación del gen *PhoD* por PCR de colonia

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen agregado (µL)
Buffer 2x colorless GoTaq®	2x	1x	12.5
Primer ALPS-F730	10 µM	1.5 µM	1.5
Primer ALPS-1101	10 µM	1.5 µM	1.5
H₂O	-	-	9.5

Fuente: Elaboración propia.

La amplificación del gen se realizó con el equipo PTC-100TM *Programmable Thermal Controller Eppendorf Mastercycler Nexus* a un volumen final de 25 μ L utilizando las siguientes especificaciones:

Cuadro 3. Condiciones de amplificación de *PhoD*.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (segundos)</i>	<i>Ciclos</i>
<i>Desnaturalización inicial</i>	95	120	1
<i>Desnaturalización</i>	95	30	40
<i>Alineamiento</i>	64	34	
<i>Extensión</i>	72	45	
<i>Extensión final</i>	72	300	1
<i>Almacenamiento</i>	4	∞	1

Fuente: Elaboración propia.

Para visualizar los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de 2 % de agarosa con Buffer TBE 1x, el marcador molecular *Thermo scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder ready-to-use*.

VII. RESULTADOS

A. Identificación del aislamiento bacteriano con mayor índice de solubilización de fosfatos

Para la determinación del índice de solubilización de fosfatos de los aislamientos bacterianos se realizaron cultivos de cada bacteria en medios de cultivo enriquecidos con 0.5 % de fosfato tricálcico. De acuerdo con los resultados obtenidos únicamente 52 de los 110 aislamientos bacterianos son capaces de segregar ácidos orgánicos al medio como mecanismo de solubilización de fosfatos, ya que los demás aislamientos no presentaron halo de solubilización, pero sí crecimiento, por lo que el resultado se interpreta como negativo para solubilización a pesar de que sí haya crecimiento.

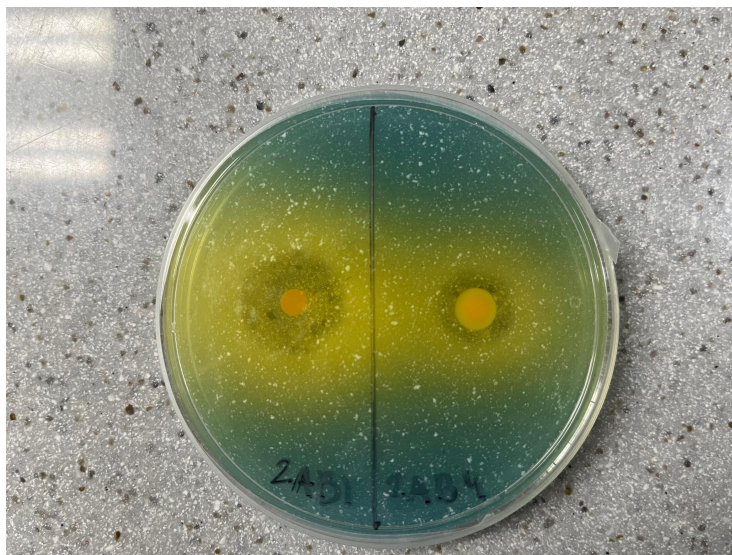


Figura 5: Aislamientos bacterianos inoculados en agar NBRIP con azul de bromotimol

En la figura anterior se muestra el medio de cultivo NBRIP con azul de bromotimol, el medio de cultivo se muestra dividido por la mitad en partes iguales con las colonias bacterianas en el centro. Alrededor de las colonias se muestra una región de color amarillo y más cercano a las colonias se observa un halo de solubilización transparente.

Cuadro 4: Resultados de determinación del Índice de solubilización (SI) de las especies bacterianas

Especie bacteriana	Índice de solubilización (SI)
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	7.7
<i>Aeromonas caviae</i>	6.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.7
<i>Lelliottia amnigena</i>	4.3
<i>Klebsiella aerogenes</i>	4.3
<i>Acinetobacter soli</i>	4.1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4.1
<i>Bacillus mycoides</i>	3.9
<i>Acinetobacter pittii</i>	3.9
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	3.7

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro anterior se muestran los 10 aislamientos bacterianos con mayor índice de solubilización (SI) ordenados de forma descendente.

Predominancia de las cepas agrupadas por género

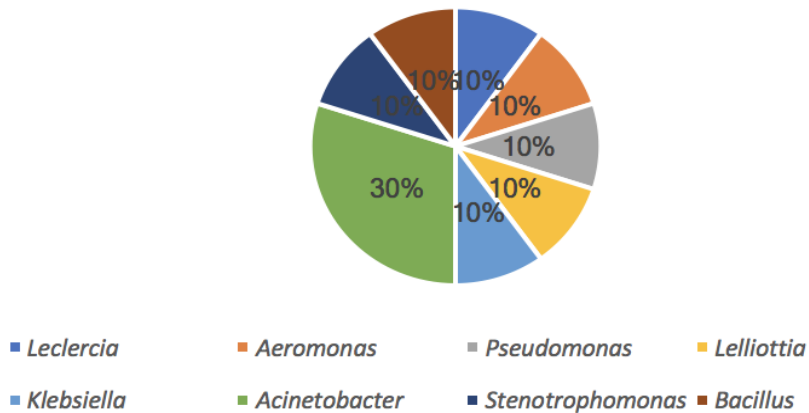


Figura 6: Gráfico circular de proporciones de las cepas bacterianas agrupadas por género

En la figura anterior se muestran las 10 cepas bacterianas que presentan mayor índice de solubilización (SI) agrupadas por género.

B. Determinación de la cantidad de fosfato solubilizado.

Para la determinación de la cantidad de fosfato solubilizado se realizó un cultivo bacteriano en 25 mL de medio líquido NBRIP, luego de 24 horas en incubación a 28 0C con agitación constante, se centrifugó a 13,500 rpm durante 5 min. Luego se colectó 1.5 mL del sobrenadante, utilizando una curva de calibración de fosfato de potasio dibásico (KH₂PO₄) se mide la densidad óptica a 882 nm.

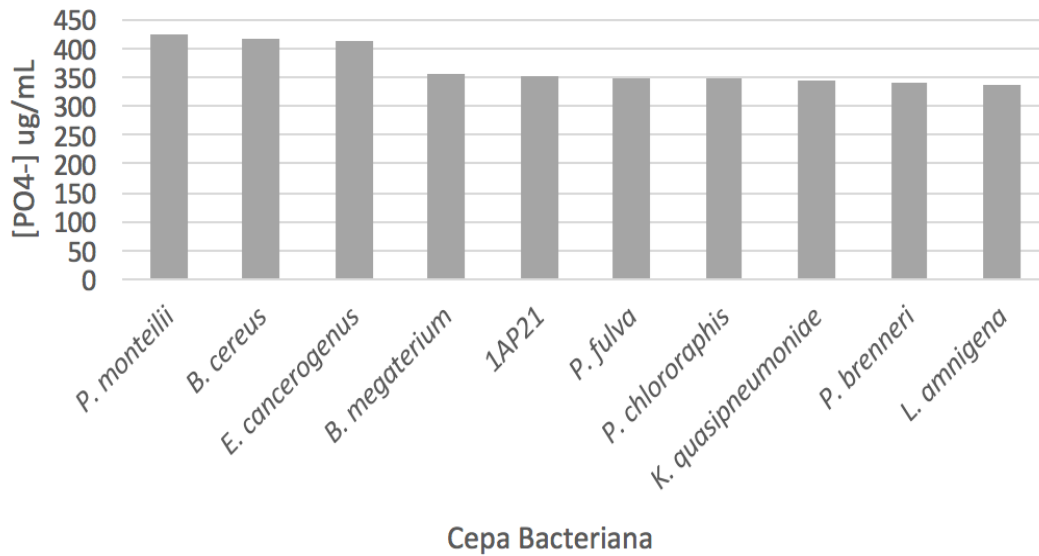
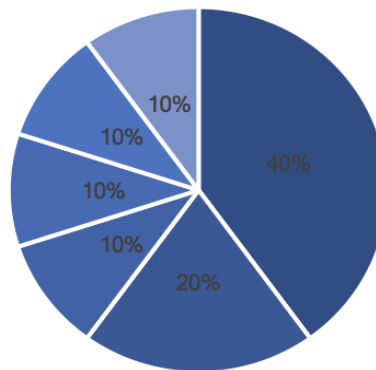


Figura 7: Cantidad de fosfato solubilizado por la cepa bacteriana en 24 horas

En la figura anterior se muestran las 10 cepas bacterianas con mayor cantidad de fosfato solubilizado vs la cantidad de iones (PO₄⁻) en el medio luego de 24 horas de incubación con agitación a 28 oC.



■ *Pseudomonas* ■ *Bacillus* ■ *Enterobacter* ■ No concluyente ■ *Klebsiella* ■ *Lelliottia*

Figura 8: Gráfico circular de proporciones de las cepas bacterianas agrupadas por género

En la figura anterior se muestran las 10 cepas bacterianas que presentan mayor cantidad de fosfato solubilizado agrupadas por género.

C. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina.

Para la determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina bacteriana se realizó un ensayo de actividad enzimática utilizando espectrofotometría UV-VIS. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que es capaz de producir 1nmol de *p*-nitrofenol a partir de fosfato disódico *p*-nitrofenil.

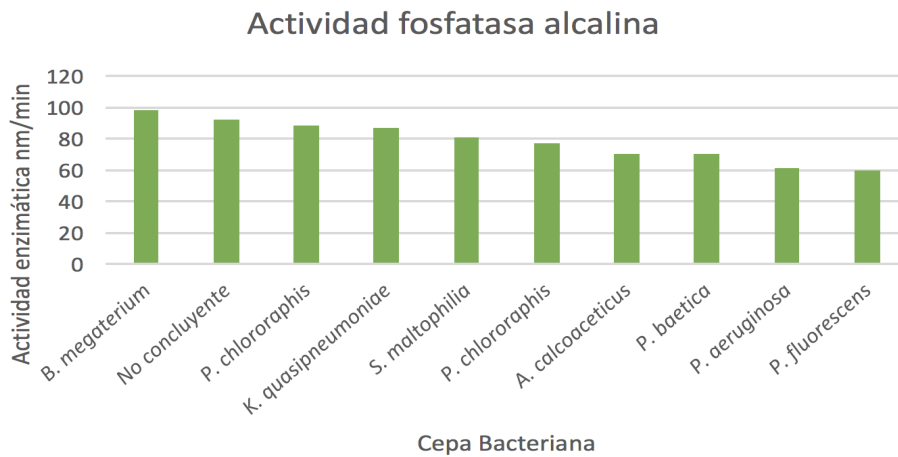


Figura 9: Actividad enzimática presentada por la cepa bacteriana

En la figura anterior se muestran las 10 cepas bacterianas que presentan mayor actividad enzimática.

Predominancia de las cepas agrupadas por género

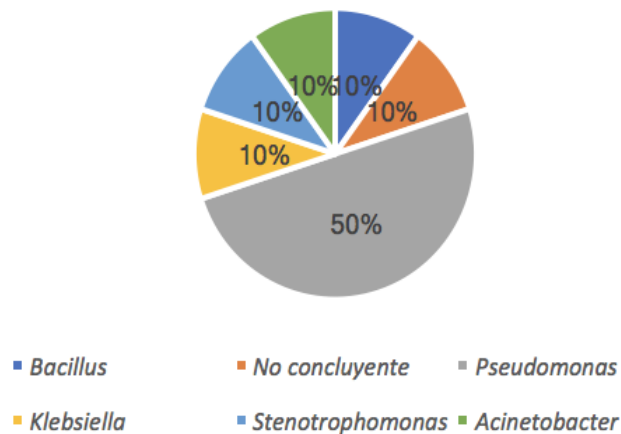


Figura 10: Gráfico circular de proporciones de las cepas bacterianas agrupadas por género

En la figura anterior se muestran las 10 cepas bacterianas que presentan mayor actividad enzimática agrupadas por género.

D. Detección de la presencia del gen regulador *PhoD*.

Para la detección del gen regulador PhoD en el genoma de las cepas bacterianas seleccionadas se realizó un PCR de colonia con las especificaciones mencionadas en metodología. Los productos de PCR se visualizaron a través de electroforesis en gel 2 % de agarosa.

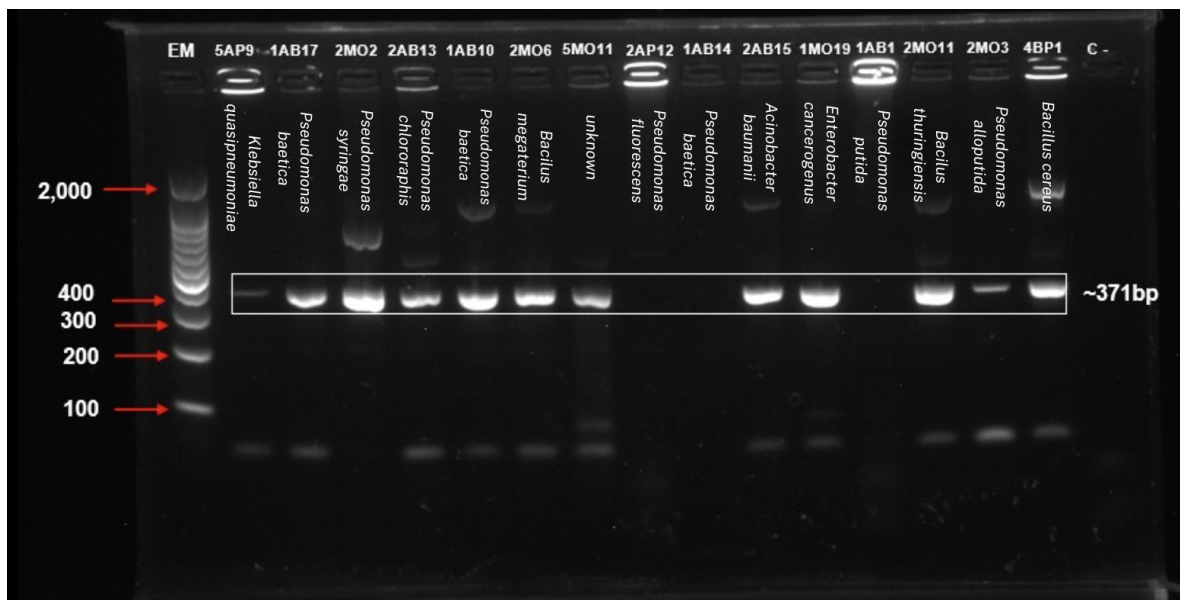


Figura 11: Amplificación del gen regulador PhoD de las cepas bacterianas seleccionadas

En la figura anterior se muestran las amplificaciones del gen regulador PhoD en las cepas bacterianas de 5AP9 a 4BP1 donde EM (Escalera Molecular) y C- (control negativo) el rectángulo blanco marca la banda de interés a 371 pares de bases.

Predominancia del gen *PhoD* en los aislamientos bacterianos.

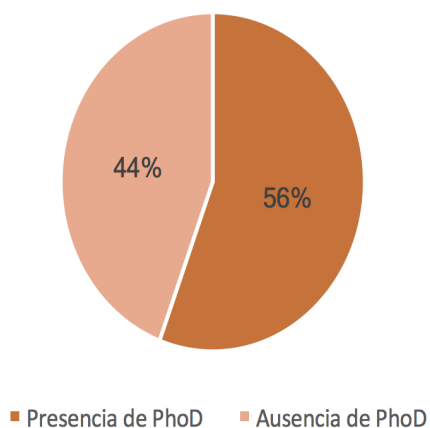


Figura 12: Gráfico circular de proporciones de las cepas bacterianas agrupadas por presencia o ausencia del gen *PhoD*

En la figura anterior se muestran las 52 cepas bacterianas aisladas de suelo agrupadas por presencia o ausencia del gen *PhoD*

Cuadro 5: Cepas bacterianas de interés

<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Acinetobacter</i>
1AP23/ <i>P. monteilii</i>	4BP1/ <i>B. cereus</i>	1CA3/ <i>A. pittii</i>
1BP2/ <i>P. fulva</i>	AB4/ <i>B. megaterium</i>	2AB18/ <i>A. calcoaceticus</i>
2AB13/ <i>P. chlororaphis</i>	3AP9/ <i>B. mycoides</i>	

Fuente: Elaboración propia.

Cepas bacterianas de interés seleccionadas con base en su capacidad para la solubilización de fosfatos y positivo a amplificación del gen *PhoD*.

VIII. DISCUSIÓN

El uso continuo de fertilizantes químicos fosfatados ha demostrado tener efectos negativos en la salud del suelo a largo plazo (Duncan et al., 2019). Por lo tanto, es crucial buscar alternativas a las prácticas agrícolas convencionales que dañan el suelo y los cultivos. En cuanto a la disponibilidad de fósforo en el suelo, las bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB) se presentan como una solución viable para reemplazar los fertilizantes químicos fosfatados (Chad et al., 2010).

Las PSB ofrecen varias ventajas sobre los fertilizantes químicos. Son más sostenibles, ya que no provocan acumulación de fósforo en el suelo ni contaminan el medio ambiente. Además, son más eficientes, ya que las plantas pueden absorber el fósforo solubilizado por las PSB más fácilmente, gracias a la relación simbiótica entre las bacterias y las plantas en el metabolismo del fósforo (Rosas et al., 2007).

La investigación sobre el uso de PSB en la agricultura está en marcha y sugiere que las PSB podrían convertirse en una herramienta clave para la agricultura sostenible en el

futuro. Es esencial tener en cuenta varias consideraciones para el estudio, como el índice de solubilización bacteriano, que es la proporción entre el diámetro del halo de solubilización y la colonia bacteriana. Tanto el crecimiento de la colonia como la dispersión del halo de solubilización dependen de diversos factores, incluyendo la viscosidad del medio, la temperatura de incubación y el tiempo de generación de la especie bacteriana estudiada. Si bien autores como Kiprotich et al., (2023) apoyan la idea que el índice de solubilización bacteriano puede fluctuar respondiendo a estos factores, en general se establece que es una medición confiable para cuantificar indirectamente la cantidad de secreción de ácidos orgánicos al medio extracelular. Ya que de manera general los ácidos orgánicos son difíciles de cuantificar porque puede haber muchas especies químicas que califican como ácidos orgánicos como el ácido cítrico, ácido láctico y ácido fórmico (Kiprotich et al., 2023).

En la experimentación para determinar el nivel de secreción de ácidos orgánicos en las cepas bacterianas, los resultados muestran que, de las 110 cepas originalmente seleccionadas, solo 52 fueron capaces de solubilizar fosfatos. Esto se evidencia en el hecho que, aunque todas las cepas mostraron crecimiento, únicamente estas 52 presentaron halos de solubilización, como se puede observar en el cuadro 4. En consecuencia, el resto de los experimentos se realizó exclusivamente con estas cepas.

Los resultados indican que diversos géneros bacterianos son capaces de secretar ácidos orgánicos en el suelo, entre ellos *Leclercia*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Lelliotia*, y *Bacillus*. Es importante destacar que el género *Acinetobacter* representa el 30 % de las cepas con el mejor índice de solubilización, con un rango en el índice de solubilización que varía de 3.7 a 7.7 dependiendo de las

condiciones del medio y la cepa específica (Adesemoye et al., 2008; Santoyo et al., 2012). Las bacterias pertenecientes al género *Acinetobacter* son capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de carbono como azúcares, polisacáridos, lípidos y proteínas (Dimkic et al., 2022). encabezando la secreción de ácidos orgánicos es un resultado totalmente esperado y apoyado por la literatura (Mohamed et al., 2012).

En estudios recientes, *Acinetobacter baumannii* ha sido identificado como una especie destacada dentro del género *Acinetobacter* por su capacidad no sólo de adaptarse a diversas condiciones ambientales, sino también por su habilidad para solubilizar fosfatos. Esta especie ha mostrado versatilidad en el uso de diferentes fuentes de fósforo, lo cual es crucial en entornos con limitaciones de nutrientes. Esta especie es un ejemplo claro de cómo las bacterias del género *Acinetobacter* pueden jugar un papel importante en la solubilización de fosfatos y en la promoción del crecimiento vegetal en suelos agrícolas.

Los resultados muestran que los géneros bacterianos *Leclercia*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Lelliotia*, y *Bacillus* están representados entre los diez mejores aislamientos bacterianos, aquellos que alcanzaron los índices más altos de solubilización de fosfatos en el experimento. Cada uno de estos géneros contribuye con un representante que forma parte de este grupo destacado, lo que equivale a un 10 % de representación por género en los aislamientos con mejor desempeño.

Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que estos géneros bacterianos están asociados de manera significativa con la rizósfera de la caña de azúcar en Guatemala. Además, respaldan la idea de que estas bacterias promueven el crecimiento vegetal a través de la solubilización de fosfatos, un proceso mediado por la secreción de ácidos orgánicos. Este comportamiento las posiciona como bacterias de interés en la mejora de la

productividad agrícola, especialmente en cultivos como la caña de azúcar, donde la disponibilidad de fósforo es crucial para el desarrollo de la planta.

La medición de fosfato solubilizado en un medio acuoso se realiza mediante espectrofotometría, utilizando una longitud de onda de 882 nm. Esta técnica permite interpretar la absorción de luz como una medida indirecta de la concentración del ion fosfato (PO_4^{3-}). En este contexto, una mayor absorción de luz a 882 nm indica una mayor concentración de fosfato, dado que un número mayor de moléculas está presente para absorber esa longitud de onda específica (Skoog et al., 2013).

Durante la experimentación para determinar la cantidad de fosfato solubilizado por las cepas bacterianas, se utilizó una curva de calibración basada en fosfato de potasio dibásico (KH_2PO_4). Este compuesto se disocia completamente en sus iones constituyentes en solución, liberando el ion fosfato (PO_4^{3-}) en el medio. La curva de calibración sirve como línea base para comparar y medir la eficacia de la solubilización de fosfatos por las bacterias, permitiendo una cuantificación precisa de este proceso (Kiprotich et al., 2023).

Los resultados sugieren que, en cuanto a la solubilización de fosfatos, ciertos géneros bacterianos muestran una mayor eficiencia, como se evidencia en las figuras 4 y 5. En este experimento se midieron específicamente los mecanismos de secreción de ácidos orgánicos y enzimas extracelulares, que son fundamentales en la solubilización de fosfatos. Los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* destacan por ocupar nichos clave en la solubilización de fosfatos en los suelos, presentándose con mayor frecuencia que los especímenes de otros géneros.

Esta tendencia está respaldada por la literatura, la cual ha identificado hasta cinco mecanismos moleculares bacterianos distintos que contribuyen a la solubilización de fosfatos, aunque no todos ellos han sido completamente descritos (Billah et al., 2019). Por lo tanto, es razonable pensar que varios de estos géneros bacterianos presentan uno o más de estos mecanismos en diferentes combinaciones, lo que explica la diversidad observada entre las 10 cepas con mayor capacidad de solubilización de fosfatos. Sin embargo, *Pseudomonas* y *Bacillus* encabezan la lista, probablemente debido a sus características específicas, las cuales se discutirán más adelante en el documento.

Este patrón sugiere que la presencia y efectividad de estos géneros en la solubilización de fosfatos no es casual, sino que está sustentada por mecanismos bien establecidos y documentados, lo que refuerza su importancia en la promoción del crecimiento vegetal a través de la mejora de la disponibilidad de fósforo en el suelo.

Las enzimas fosfatasas bacterianas juegan un papel crucial en la catalización de la hidrólisis de fosfatos, facilitando la liberación de fósforo disponible para las plantas en el suelo (Rodríguez y Fraga, 1999). En el ámbito agrícola, las bacterias que poseen estas enzimas codificadas en su genoma pueden secretarlas al medio, donde actúan liberando fósforo, lo que es esencial para la nutrición vegetal. La cuantificación de la actividad enzimática se realiza mediante espectrofotometría UV-VIS, detectando un analito específico, como se describe en la literatura (Skoog et al., 2013).

En este estudio, se aplicaron estos principios para evaluar la actividad fosfatasa de las cepas bacterianas de interés. Los resultados, como se presentan en las figuras de los resultados (ver Figuras X y Y), revelan que el género *Pseudomonas* representa el 50 % de las cepas bacterianas con mayor actividad fosfatasa. El otro 50 % se distribuye

equitativamente entre los géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, y otro emparejamiento no concluyente, con un 10 % cada uno.

La actividad de las fosfatasas puede ser modulada por diversos factores que afectan el metabolismo bacteriano (Dimkic et al., 2022). Algunas bacterias pueden producir una mayor cantidad de estas enzimas para adaptarse a condiciones como la resistencia a antibióticos o la degradación de ácidos nucleicos, lo que resulta en una variabilidad significativa en la actividad fosfatasa tanto entre especies como entre cepas individuales (Rosas et al., 2008). Específicamente, las bacterias del género *Pseudomonas* han demostrado ser particularmente eficaces en la solubilización de fosfatos a través de la actividad de sus enzimas fosfatasas, lo que explica su predominancia en las cepas con mayor actividad fosfatasa en este estudio.

El gen regulador *PhoD* codifica una enzima clave en la hidrólisis de fosfatos, facilitando la liberación de iones fosfato en el medio ambiente (Fraser et al., 2015). Aunque tanto la secreción de ácidos orgánicos como la acción de enzimas extracelulares contribuyen a la solubilización de fosfatos, estos mecanismos, aunque complementarios, son sustancialmente diferentes e independientes. Esto se refleja en los resultados, donde un 44 % de las cepas analizadas no presentaron el gen *PhoD*, pero aun así mostraron un índice de solubilización significativo y una cuantificación efectiva del fosfato liberado.

Esta observación podría explicarse por la presencia de otras variantes del gen *Pho*, como *PhoA* y *PhoX*, que pueden estar presentes en las cepas, permitiendo la solubilización de fosfatos incluso en ausencia de *PhoD*. El regulón *Pho* es conocido por ser un sistema regulatorio extremadamente complejo, esencial para la homeostasis bacteriana, y aún no

se ha caracterizado por completo el conjunto de genes involucrados en la respuesta a la escasez de fósforo, conocida como "P-starvation", en los suelos (Rosas et al., 2007).

Esta complejidad subraya la necesidad de continuar explorando los mecanismos moleculares involucrados en la solubilización de fosfatos para comprender mejor cómo las bacterias adaptan su metabolismo a entornos con limitaciones de nutrientes, y cómo estas adaptaciones pueden ser aprovechadas en aplicaciones agrícolas.

Las proporciones de detección del gen *phoD* sugieren que existe una tendencia a que la mayoría de las bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) presenten este gen, dado que se reportó su presencia en un 56 % de los aislamientos evaluados como se ve en la figura 12. Sin embargo, esta tendencia podría variar si se amplía el tamaño de la muestra. Los resultados indican que no hay un patrón claro observable en las cepas bacterianas para predecir la presencia de este gen, ya que algunas cepas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* no presentan el gen *phoD*, pero aun así demuestran ser muy eficientes en la solubilización de fosfatos.

Esto sugiere que una especie bacteriana puede carecer de un mecanismo específico para la solubilización de fosfatos y, sin embargo, ser muy eficaz a través de otros mecanismos. Es importante destacar que el gen *phoD* codifica para una fosfatasa alcalina, pero no es el único gen asociado con estas enzimas. Los genes *phoX* y *phoA* también codifican este tipo de enzimas, lo que podría explicar la distribución y prevalencia observadas del gen *phoD* (ver Figura 12).

La literatura ha correlacionado los niveles de expresión del gen *phoD* con la presencia de formas orgánicas de fósforo en el suelo (Lang et al., 2021). Esto se debe a que los niveles de expresión de un gen suelen relacionarse con la sobrerregulación de la

maquinaria celular involucrada en procesos específicos. En el contexto de la escasez de fósforo o “P-starvation”, se activa la expresión de genes como *phoD*, lo que se asocia con una mayor cantidad de fósforo orgánico en el suelo. Aunque en este estudio no se cuantificó directamente la expresión de *phoD*, el enfoque cuantitativo proporciona un contexto exploratorio sobre la presencia de este gen en las comunidades bacterianas del suelo.

Respecto a los hallazgos de este estudio, se ha identificado que varios géneros bacterianos tienen un gran potencial para ser utilizados en la formulación de biofertilizantes debido a sus características metabólicas y capacidades específicas para promover el crecimiento vegetal.

El género *Pseudomonas* es ampliamente reconocido por su versatilidad metabólica, lo que explica su elevada actividad fosfatasa (ver figura 7). De hecho, este género representa el 50 % de las cepas con mayor actividad fosfatasa en el estudio y un 40 % en las cepas con mayor solubilización de fosfatos. Estas características lo convierten en un candidato ideal para el desarrollo de biofertilizantes. Varias especies de *Pseudomonas*, como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, ya han sido utilizadas en la formulación de biofertilizantes debido a su capacidad para solubilizar fosfatos y producir sideróforos, lo que mejora la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Billah et al., 2019; Bhattacharjee et al., 2014).

El género *Bacillus* también juega un papel clave como bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPB) a través de la solubilización de fosfatos. Especies como *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* han sido utilizadas en biofertilizantes comerciales por su capacidad para solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno, lo que mejora la fertilidad del suelo y el crecimiento de las plantas (Lang et al., 2021; Bhardwaj et al., 2014). Este género

es conocido por su capacidad de formar esporas, lo que le otorga una mayor resistencia y viabilidad en diferentes formulaciones de biofertilizantes.

El género *Acinetobacter* se ha caracterizado por su capacidad para la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y solubilización de fosfatos, características que lo posicionan como un potencial biofertilizante. Especies como *Acinetobacter calcoaceticus* han sido estudiadas por su capacidad para mejorar la fertilidad del suelo y promover el crecimiento vegetal, aunque su aplicación en biofertilizantes comerciales aún está en una etapa exploratoria comparada con *Pseudomonas* y *Bacillus* (Bashan et al., 1989; Gyaneshwar et al., 1995).

Este estudio apoya la evidencia existente en la literatura sobre el potencial de estos géneros para ser utilizados en la agricultura, especialmente en la formulación de biofertilizantes en Guatemala, que pueden optimizar el uso de fosfatos y otros nutrientes en los cultivos. La consideración de estos géneros en el desarrollo de biofertilizantes es una estrategia prometedora para mejorar la sostenibilidad agrícola (Bhattacharjee y Dey, 2014; Bhatt y Maheshwari, 2020).

Aunque este estudio aporta información valiosa sobre la solubilización de fosfatos a través de microorganismos, es importante reconocer las limitaciones inherentes, como el tamaño de la muestra y la validez externa del estudio.

Las comunidades bacterianas en el suelo son extremadamente diversas debido a sus interacciones con otros microorganismos y seres vivos, como plantas y animales. Esta diversidad es crucial para la salud del suelo, ya que sus interacciones ecológicas juegan un papel fundamental. Además, las condiciones climatológicas influyen significativamente en el crecimiento bacteriano en el suelo, lo que sugiere que el clima de la región geográfica

puede determinar qué bacterias aprovechan los nichos de solubilización de fosfatos en la dinámica del suelo.

Por lo tanto, las cepas identificadas en este estudio pueden ser especialmente efectivas en tecnologías agrícolas en regiones con condiciones climatológicas similares a las de Guatemala, como las regiones tropicales o caribeñas. Sin embargo, en áreas con climas muy fríos o temperaturas más altas, es probable que diferentes especies bacterianas sean más adecuadas para la solubilización de fosfatos. En consecuencia, es fundamental considerar los factores climatológicos como una variable antes de aplicar estos microorganismos en la biotecnología agrícola.

Al destacar estas consideraciones, el estudio sigue proporcionando una base sólida y relevante para futuras investigaciones y aplicaciones en regiones con características similares a las estudiadas.

La cepa bacteriana desempeña un papel fundamental en la solubilización de fosfatos, ya que los resultados sugieren que pueden existir individuos de la misma especie con capacidades de solubilización de fosfatos significativamente distintas. Esto implica que las cepas identificadas en esta investigación podrían diferir de las documentadas en otros estudios realizados en diferentes regiones geográficas, como el de Kiprotich et al. (2023), que reporta la presencia de otras especies en Kenia. Sin embargo, es notable que los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* se mantengan consistentemente en la lista de bacterias solubilizadoras de fosfatos, lo que subraya su relevancia en diferentes contextos agrícolas a nivel mundial.

Los resultados de este estudio indican que las cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (incluyendo *P. monteilii*, *P. fulva* y *P. chlororaphis*), *Acinetobacter*

(como *A. pitti* y *A. calcoaceticus*), y *Bacillus* (como *B. cereus*, *B. megaterium* y *B. mycooides*) tienen un potencial significativo para mejorar la disponibilidad de fósforo en suelos de Guatemala a través de la solubilización de fosfatos. No obstante, dado que este estudio se realizó *in vitro* bajo condiciones de laboratorio con cultivos bacterianos puros, es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales para confirmar si estas cepas pueden efectivamente promover el crecimiento vegetal en condiciones reales de campo adaptándose a la dinámica de los suelos.

Una consideración clave para avanzar en esta investigación es la realización de pruebas de antagonismo. Estas pruebas, efectuadas *in vitro*, permiten determinar si el crecimiento de un microorganismo inhibe al de otro o si ambos pueden coexistir en el mismo ambiente. Para formular un biofertilizante basado en la solubilización de fosfatos, es crucial realizar estas pruebas para evitar que las bacterias seleccionadas se inhiben mutuamente, lo cual podría comprometer la eficacia del biofertilizante.

Es fundamental llevar a cabo estudios de invernadero utilizando diferentes especies y cultivares de plantas. Estas plantas se cultivarían en suelos tratados con las cepas bacterianas identificadas y se compararía su crecimiento con el de plantas cultivadas en suelos no tratados con estas cepas. Estos estudios ayudarían a comprender mejor el impacto directo de las bacterias en un entorno controlado, pero más cercano a las condiciones naturales que el laboratorio. Posteriormente, se recomienda realizar estudios en condiciones agrícolas reales, donde las plantas se cultivarían en suelos tratados con las cepas bacterianas y se compararía su rendimiento con plantas cultivadas en suelos sin tratamiento bacteriano. Estos estudios proporcionarían datos cruciales sobre la eficacia de

las cepas en un contexto agrícola práctico, considerando las variables ambientales y ecológicas del entorno natural.

La implementación de estos pasos adicionales es fundamental para validar el uso de estas cepas bacterianas como biofertilizantes efectivos en la mejora de la fertilidad del suelo y la promoción del crecimiento vegetal en Guatemala y otras regiones con climas similares.

Para futuras investigaciones, se recomienda incluir la detección de más genes del regulón *Pho*, como *PhoA*, *PhoX* y *PhoC*, en las cepas bacterianas de interés para correlacionar su presencia con un mayor índice de solubilización y/o una mayor cantidad de fosfato solubilizado. Asimismo, sería esencial adoptar un enfoque cuantitativo para medir la expresión del gen *phoD* y así obtener una comprensión más profunda de la dinámica del fósforo en los suelos y del papel que desempeñan estas bacterias en dicho proceso.

Este estudio resalta el potencial de diversas cepas bacterianas de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Bacillus* para ser consideradas en investigaciones futuras orientadas a la formulación de biofertilizantes. Las cepas específicas que se destacan incluyen *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas fulva* y *Pseudomonas chlororaphis*, todas ellas pertenecientes al género *Pseudomonas*, conocidas por su versatilidad metabólica y su capacidad para solubilizar fosfatos. Por otro lado, dentro del género *Bacillus*, se identificaron *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus mycoides*, las cuales han demostrado ser eficaces en la solubilización de fosfatos y la promoción del crecimiento vegetal, además de ser conocidas por su resistencia y capacidad de formar esporas. Finalmente, el género *Acinetobacter* está representado por las cepas *Acinetobacter pittii* y

Acinetobacter calcoaceticus, ambas destacadas por su capacidad de solubilizar fosfatos y otras funciones relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal.

Estas cepas han mostrado un gran potencial en términos de solubilización de fosfatos y promoción del crecimiento vegetal, pero se requiere más investigación para determinar su aplicabilidad en la biotecnología agrícola y su impacto en la salud de los suelos en Guatemala. Este enfoque no solo contribuirá al desarrollo de estrategias de manejo sostenible del suelo, sino que también podría mejorar significativamente la productividad agrícola. Al comprender mejor cómo interactúan estas cepas bacterianas en los suelos, se podrían optimizar los recursos naturales y aumentar la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, especialmente en regiones tropicales y otras áreas con condiciones climáticas similares.

Como se observa en el cuadro 5 las cepas bacterianas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Acinetobacter* han sido identificadas como de particular interés en este estudio debido a su notable capacidad para la solubilización de fosfatos. Estas cepas bacterianas fueron seleccionadas en función de su destacado rendimiento en los tres experimentos cuantitativos realizados, así como por haber dado positivo en la amplificación del gen *phoD*.

IX. CONCLUSIONES

- Se seleccionaron cepas bacterianas candidatas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y *Acinetobacter* con características promotoras del crecimiento vegetal con base en su capacidad para solubilizar fosfatos por medio de ácidos orgánicos y enzimas extracelulares.
- Se identificaron los géneros bacterianos: *Acinetobacter*, *Leclercia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Lelliottia*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas* y *Bacillus* como bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a la rizósfera de la caña de azúcar en Escuintla Guatemala.
- Se seleccionaron cepas específicas dentro de los géneros *Pseudomonas* (*Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas chlororaphis*), *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*) y *Acinetobacter* (*Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter calcoaceticus*) como microorganismos de particular interés en esta investigación debido a su destacada capacidad para solubilizar fosfatos mediante la secreción de ácidos orgánicos y la producción de enzimas extracelulares. Estos

resultados subrayan su potencial para ser utilizados como biofertilizantes alternativos a los fertilizantes químicos fosfatados, con aplicaciones prometedoras en la biotecnología agrícola de Guatemala. Sin embargo, se recomienda realizar investigaciones adicionales para validar su eficacia y aplicabilidad a nivel comercial.

X. RECOMENDACIONES

- Es recomendado realizar las pruebas moleculares con una mayor cantidad de genes que componen el complejo *Pho*, incluyendo *PhoA*, *PhoX* y *PhoC* con el propósito de detectar la presencia de estos genes en las cepas bacterianas de interés. De igual forma para correlacionar su presencia con un mayor índice de solubilización y/o una mayor cantidad de fosfato solubilizado. De manera general se recomienda realizar análisis moleculares que permitan cuantificar la cantidad de copias del gen objetivo como la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) para poder correlacionar sus niveles de expresión con la concentración de fósforo en los suelos.
- Como siguiente paso en la investigación es altamente recomendado realizar análisis de antagonismo de las cepas bacterianas de interés, especialmente de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Bacillus*. Con la finalidad de realizar formulaciones de biofertilizantes que involucren consorcios

bacterianos de microorganismos que no presentan actividad antagonista entre ellos.

XI. LITERATURA CITADA

- Adesemoye, A. O., Obini, M., Ugoji, E. (2008). Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 423-426. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000300003>
- Ahemad, M. (2015). Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: a review. 3 *Biotech.* 5(2), 111-121. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0206-0>
- Ahemad, M., Kribet, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University*. 26(1), 1-20. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364713000293?via%3Dihub>
- Ajijah, N., Fiodor, A., Pandey, A. K., Rana, A., Pranaw, K. (2023). Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with biofilm-forming ability: A multifaceted agent for sustainable agriculture. *Diversity*, 15(1), 112. <https://www.mdpi.com/1424-2818/15/1/112>

- Aulakh, M. S., Khera, T. S., Doran, J. W. (2008). Mineralization of phosphorus in soils amended with organic residues. *Biology and Fertility of Soils*, 44(1), 49-59.
- Banerjee, S., van der Heijden, M.G.A. (2023) Soil microbiomes and one health. *Nat Rev Microbiol* 21(1), 6–20. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00779-w>
- Barker, A. (2018). Fertilizers. *Encyclopedia of analytical science (Third edition)*, 134-144. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.00142-6>
- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P. B., Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Favreto, R., ... Passaglia, L. M. P. (2013). Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 63, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.08.010>
- Bollag, J. M., Edelstein, M. (2010). Mineralization of organic phosphorus in soils: A critical review. *Soil Science Society of America Journal*, 74(3), 953-962.
- Cade-Menun, B. J., Preston, C. M., Paustian, K. (2013). Soil organic matter dynamics: Implications for soil carbon sequestration and soil fertility management in mineralizable carbon tests. *Soil Science Society of America Journal*, 77(1), 201-215.
- Chand, S., Somani, L. L., Bhandari, S. C. (2010). Effect of fertilizer, farmyard manure (FYM) and biofertilizer on the population of Azotobacter and phosphate solubilising bacteria (PSB) in the soil. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 58(4), 460-463.
- Cruz, C., Cardoso, P., Santos, J., Matos, D., Figueira, E. (2022). Bioprospecting soil bacteria from arid zones to increase plant tolerance to drought: growth and biochemical status of maize inoculated with plant growth-promoting bacteria

- isolated from sal island, cape verde. *Plants*, 11(21), 2912.
<https://doi.org/10.3390/plants11212912>
- Culman, S. W., Snapp, S. S., Ollenburger, M., Basso, B., DeHaan, R. L. (2013). Soil and water quality rapidly responds to the perennial grain Kernza wheatgrass. *Agronomy Journal*, 105(3), 735-744. <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0273>
- Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., Fira, D. (2022). Plant-associated Bacillus and Pseudomonas antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 117, 101754. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754>
- Doolette, A. L., Smernik, R. J., Dougherty, W. J. (2015). Transformation and mineralization of phosphorus in biosolids-amended soils: Insights from nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 49(22), 13246-13253.
- Duncan, E. W., Osmond, D. L., Shober, A. L., Starr, L., Tomlinson, P., Kovar, J. L., Reid, K. (2019). Phosphorus and soil health management practices. *Agricultural & Environmental Letters*, 4(1), 190014. <https://doi.org/10.2134/aerl2019.04.0014>
- Espejo-Pérez, A. J., Cely-Perdomo, H., Dendooven, L. (2016). Mineralization of organic phosphorus in soils under different land use types in a tropical dry forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 96, 140-146.
- Fageria, N. K., Baligar, V. C. (2008). Enhancing nutrient use efficiency in plants. *Advances in Agronomy*, 99, 45-91.

- Fernández, V., Eichert, T. (2009). Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(1-2), 36-68. <https://doi.org/10.1080/07352680902743069>
- Filippelli, G. M. (2002). The global phosphorus cycle. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 48(1), 391-425. <https://doi.org/10.2138/rmg.2002.48.10>
- Fontúrbel Rada, F. (2005). Indicadores fisicoquímicos y biológicos del proceso de eutrofización del Lago Titikaka (Bolivia). *Ecología aplicada*, 4(1-2), 135-141. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-22162005000100018&script=sci_abstract
- Fraser, T. D., Lynch, D. H., Bent, E., Entz, M. H., Dunfield, K. E. (2015). Soil bacterial phoD gene abundance and expression in response to applied phosphorus and long-term management. *Soil Biology and Biochemistry*, 88, 137-147. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.04.014>
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24278762/>
- Hashem, A., Tabassum, B., Abd_Allah, E. F. (2019). Bacillus subtilis: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi journal of biological sciences*, 26(6), 1291-1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Hinsiger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. *Plant and soil*. 237, 173-195. <https://doi.org/10.1023/A:1013351617532>
- Kiprotich, K., Muoma, J., Omayio, D., Ndomi, T., Wekesa, C. (2023) Molecular characterization and mineralizing potential of phosphorus solubilizing bacteria

- colonizing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizosphere in western Kenya, *International Journal of Microbiology*, 2023(1), 1–10. <https://doi.org/10.1155/2023/6668097>
- López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(7), a000398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398>
- Malhotra, H., Vandana, Sharma, S., Pandey, R. (2018). Phosphorus Nutrition: Plant Growth in Response to Deficiency and Excess. In: Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H., Nahar, K., Hawrylak-Nowak, B. (eds) *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8_7
- Motsim Billah, Matiullah Khan, Asghari Bano, Tamoor Ul Hassan, Asia Munir, Ali Raza Gurmani (2019) Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture, *Geomicrobiology Journal*, 36(10), 904-916. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043>
- Mukherjee, T., Banik, A., Mukhopadhyay, S. K. (2020). Plant growth-promoting traits of a thermophilic strain of the *Klebsiella* group with its effect on rice plant growth. *Current Microbiology*, 77, 2613-2622. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02032-0>
- Murphy, L. S., Ellis Jr, R., Adriano, D. C. (1981). Phosphorus- micronutrient interaction effects on crop production. *Journal of Plant Nutrition*, 3(1-4), 593-613. <https://doi.org/10.1080/01904168109362863>
- Fageria, V. C. Baligar, y Li, Y.C. (2008). The role of nutrient efficient plants in improving crop yields in the twenty first century. *Journal of Plant Nutrition*, 31(6), 1121–1157. <https://doi.org/10.1080/01904160802116068>

- Oehl, F., Frossard, E., Fliessbach, A., Dubois, D., Oberson, A. (2004). Basal organic phosphorus mineralization in soils under different farming systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(4), 667-675. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.12.010>
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21, 49-68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>
- Rodríguez, H., Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(99)00014-2)
- Rosas, S.B., Rovera, M., Andrés, J.A., Correa, N.S. (2007). Effect of phosphorous solubilizing bacteria on the rhizobia-legume symbiosis. In: Velázquez, E., Rodríguez-Barrueco, C. (eds) First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. *Developments in Plant and Soil Sciences*, 102. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_17
- Ruangsanka, S. (2014) Identification of phosphate-solubilizing bacteria from the bamboo rhizosphere, *ScienceAsia*, 40(3), 204. <https://www.scienceasia.org/content/viewabstract.php?ms=4111>
- Kumar, S., Kumar, S., y Mohapatra, T. (2021). Interaction between macro- and micro-nutrients in plants. *Frontiers of Plant Science*, 12, 665583

<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.665583>

- Sánchez, A. M. I. (2021). Development of microbial technologies for the soluble phosphorus production by phosphate rock solubilization (Tesis de doctorado). Universidad de León. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=295962>
- Santos-Beneit, F. (2015). The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 402. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00402>
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>
- Savci, S. (2012). An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1), 73-80. https://www.researchgate.net/publication/271211913_An_Agricultural_Pollutant_Chemical_Fertilizer
- Savci, S. (2012). Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. *Apacbee Procedia*, 1, 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.03.047>
- Sharma, V., Kaur, J., Sharma, S. (2020). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: potencial para la agricultura sostenible. *Bioteconología Vegetal*, 20(3), 157-166. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-86472020000300157
- Singh, A., Varma, A., Prasad, R., Porwal, S. (2022). Bioprospecting uncultivable microbial diversity in tannery effluent contaminated soil using shotgun sequencing and bio-

- reduction of chromium by indigenous chromate reductase genes. *Environmental research*, 215, 114338. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114338>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2013). *Fundamentals of analytical chemistry*. Cengage learning.
- Srivastava, A. K., Das, A. K., Jagannadham, P. T. K., Bora, P., Ansari, F. A., Bhate, R. (2022). Bioprospecting microbiome for soil and plant health management amidst huanglongbing threat in citrus: a review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 858842. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.858842>
- Velten, S., Leventon, J., Jager, N., Newig, J. (2015). What is sustainable agriculture? A systematic review. *Sustainability*, 7(6), 7833-7865. <https://doi.org/10.3390/su7067833>
- Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M., Oves, M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284. <https://doi.org/10.1556/AMicr.56.2009.3.6>

XII. ANEXOS

Anexo 1. Datos de cepas bacterianas

Cuadro 6: Datos de todas las cepas bacterianas

Código aislamiento bacteriano	Especie bacteriana	Índice de solubilización de fosfatos	Cantidad de fosfato solubilizado (ug/mL)	Actividad fosfatasa (nmol/min)	Presencia del gen <i>PhoD</i>
1MO7	<i>Leclercia Adecaboxylata</i>	7.7	320	41.7	Ausente
1AP23	<i>Pseudomonas monteilii</i>	3.5	422	31.5	Ausente
4BP1	<i>Bacillus cereus</i>	2.3	415	17.9	Presente
1MO19	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	2.4	411	24.9	Presente
2AB4	<i>Bacillus megaterium</i>	2.7	356	98.5	Ausente
1AP21	<i>Inconcluso</i>	1.9	351	16.3	Ausente
1BP2	<i>Pseudomonas fulva</i>	3.3	346	41.7	Presente
2AB13	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2.5	346	76.9	Presente
5AP9	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	2.6	344	87.0	Presente
1AB21	<i>Pseudomonas brenneri</i>	3.1	340	54.1	Ausente
1MO21	<i>Lelliottia amnigena</i>	4.3	336	47.7	Presente
1MO23	<i>Klebsiella aerogenes</i>	4.3	333	37.5	Ausente
4AB3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4.1	320	81.3	Ausente
1MO17	<i>Lelliottia amnigena</i>	2.7	320	8.3	Ausente

3AP9	<i>Bacillus mycoides</i>	3.9	310	21.1	Presente
2AB18	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	3.7	302	70.3	Presente
2MO2	<i>Pseudomonas syringae</i>	2.5	300	35.4	Presente
3AP15	<i>Inconcluso</i>	4.1	286	43.7	Ausente
1AB25	<i>Pseudomonas helmaticensis</i>	3.2	284	24.4	Ausente
3AB2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.7	280	61.3	Presente
2AB1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	6.5	280	49.6	Ausente
4MO3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3.7	277	48.3	Ausente
2AB11	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2.3	273	17.6	Presente
1AB27	<i>Pseudomonas bacetica</i>	3.2	270	38.4	Presente
1AB13	<i>Inconcluso</i>	3.2	269	47.2	Presente
2MO6	<i>Bacillus megaterium</i>	2.5	266	55.1	Presente
1CA3	<i>Acinetobacter pittii</i>	3.9	260	31.8	Ausente
2AB12	<i>Inconcluso</i>	3.1	254	92.3	Ausente
1AB20	<i>Pseudomonas helmaticensis</i>	2.9	253	29.5	Presente
2AB14	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2.1	250	27.2	Ausente
3AB9	<i>Inconcluso</i>	2.8	250	19.0	Presente
1AB1	<i>Pseudomonas putida</i>	2.4	248	34.0	Ausente
2MO11	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2.4	243	34.2	Presente
2MO16	<i>Pseudomonas syringae</i>	2.8	240	35.5	Presente
1AB17	<i>Pseudomonas baetica</i>	2.5	235	70.3	Presente
2MO3	<i>Pseudomonas putida</i>	2.3	231	49.0	Presente
2MO14	<i>Burkholderia cepacia</i>	2.8	228	36.2	Presente
1AB14	<i>Pseudomonas baetica</i>	2.4	227	13.1	Ausente

1AB16	<i>Pseudomonas syringae</i>	2.8	215	38.6	Presente
2AB15	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.4	211	37.0	Presente
5MO1	<i>Inconcluso</i>	2.8	210	33.5	Presente
2AB9	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2.4	205	88.7	Presente
1BP3	<i>Pseudomonas putida</i>	2.8	196	33.0	Ausente
1AB10	<i>Pseudomonas baetica</i>	2.4	194	38.6	Presente
2AP7	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	2.8	181	46.7	Ausente
1MO27	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1.9	172	29.0	Presente
2AP18	<i>Pseudomonas canadiensis</i>	2.4	160	30.3	Presente
5MO11	<i>Inconcluso</i>	2.5	152	46.2	Presente
1AP10	<i>Shingobacterium faecium</i>	1.9	144	2.1	Ausente
2AP12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2.4	132	60.1	Ausente
2BP1	<i>Chromobacteriu m rhizoryzea</i>	2.8	120	24.7	Ausente
1AP24	<i>Bacillus cereus</i>	1.9	5	20.4	Ausente

Anexo 2. Curvas de calibración

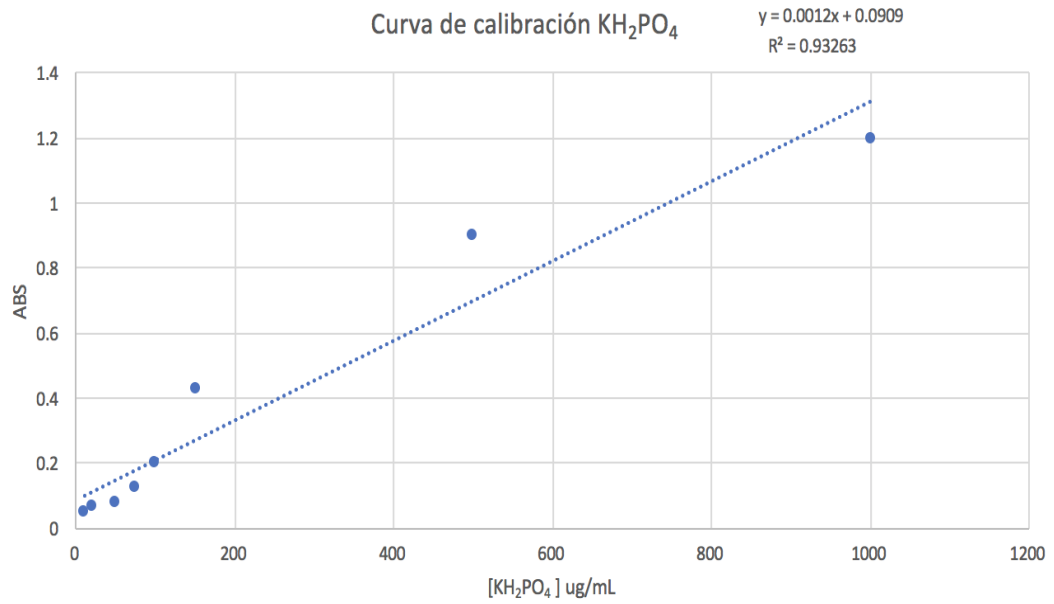


Figura 13: Curva de calibración KH_2PO_4 .

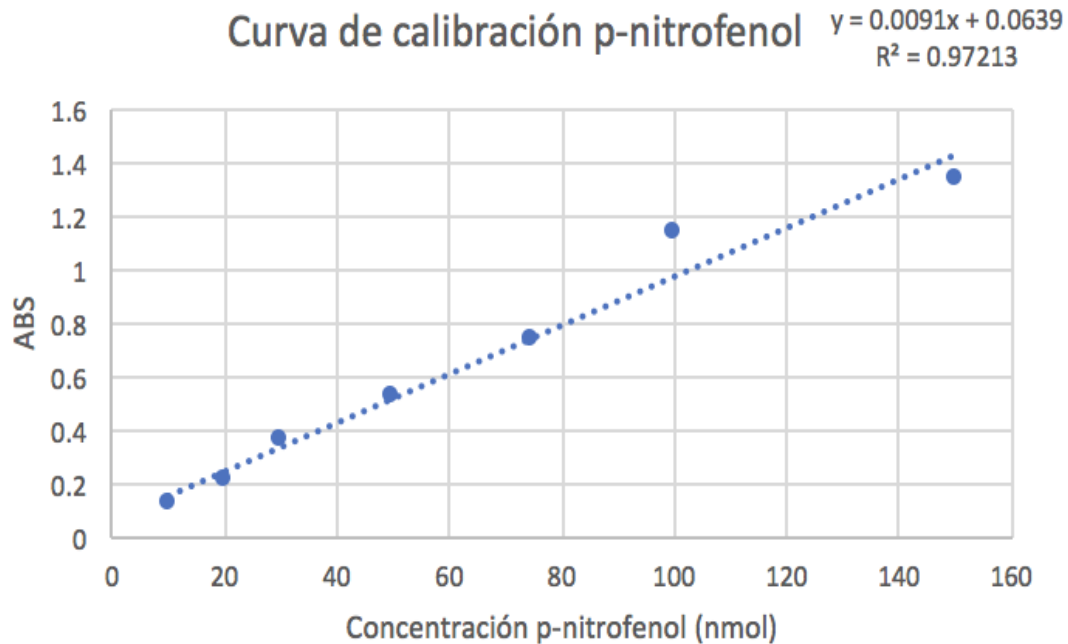


Figura 14: Curva de calibración *P*-nitrofenol.

Anexo 3. Procedimiento normado de operación

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales:
Determinación del índice de solubilización de fosfato bacteriano	Autores: PhD Dalia Lau-Bonilla, Xavier Flores-Solares

1. Propósito

Realizar una prueba para la determinación del índice de solubilización de fosforo en medios de cultivo bacterianos.

2. Aplicación

El índice de solubilización de fósforo (SI) es una medida de la capacidad de un microorganismo para solubilizar el fósforo inorgánico presente en el suelo, se calcula como

la relación entre el diámetro del halo de solubilización y el diámetro de la colonia bacteriana. El SI se interpreta como una medida indirecta de la cantidad de ácidos orgánicos que una cepa bacteriana secreta al medio, por lo que brinda valiosa información sobre la capacidad de la bacteria para solubilizar fosfatos por medio de la secreción de ácidos orgánicos. Tecnologías como esta permiten acercar a países agrícolas como Guatemala a una agricultura más sostenible y limpia independiente de los fertilizantes químicos fosfatados.

3. Referencias

- 3.1. Kiprotich, K. et al. (2023) ‘Molecular characterization and mineralizing potential of phosphorus solubilizing bacteria colonizing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizosphere in western Kenya’, *International Journal of Microbiology*, 2023, pp. 1–10. doi:10.1155/2023/6668097.
- 3.1 Murphy, L. S., Ellis Jr, R., y Adriano, D. C. (1981). Phosphorus- micronutrient interaction effects on crop production. *Journal of Plant Nutrition*, 3(1-4), 593-613.

4. Terminología

- 4.1. SI: índice de solubilización ó Solubilization index)
- 4.2. PSB: Bacterias solubilizadoras de fosfatos ó Phosphate solubilizing bacteria
- 4.3. ADN: ácido desoxirribonucleico. Molécula transportadora de información genética para el funcionamiento.
- 4.4. EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. Elimina o reduce la cantidad de calcio mediante la eliminación de iones de doble capacidad.

5. Documentos asociados

N/A

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

6.1.1. Formación de aerosoles que diseminen la bacteria.

6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de bacterias.

Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio

6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.

6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.

6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.

6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.

6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.

6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.

6.2.8. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.

6.2.9. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. **Equipo**

- 7.1.1. Micropipetas de 1000 μL
- 7.1.2. Micropipetas de 100 μL
- 7.1.3. Micropipetas de 10 μL
- 7.1.4. Estufa con agitador magnético

7.2. **Materiales/ Cristalería**

- 7.2.1. Caja petri desechable
- 7.2.2. Puntas de micropipeta de 1000 μL
- 7.2.3. Puntas de micropipeta de 100 μL
- 7.2.4. Puntas de micropipeta de 10 μL
- 7.2.5. Frasco Erlenmeyer de 450 mL
- 7.2.6. Medidor vernier

7.3. **Reactivos**

- 7.3.1. Glucosa
- 7.3.2. Fosfato de calcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- 7.3.3. Cloruro de magnesio hexahidratado $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 7.3.4. Sulfato de magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 7.3.5. Cloruro de potasio KCl
- 7.3.6. Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 7.3.7. Agar bacteriológico

7.4. **Medicamentos**

- 7.4.1. N/A

7.5. **Material biológico**

7.5.1. Cepas de bacterias PSB

8. Procedimiento

8.1. Se agrega a 1L de agua destilada los siguientes componentes, con agitación y calor constantes.

- 10g glucosa
- 5g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- 5g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0.25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.2g KCl
- 0.1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 15 g Agar
- 0.1g Azul de bromotimol

8.2. Esterilizar el medio en autoclave a 121 °C y 15 psi

8.3. Con el medio esterilizado, servir en cajas Petri estériles

8.4. Inocular 10uL de cultivo bacteriano en el centro de la placa.

8.5. Incubar a temperatura ambiente durante 7 días, ó durante 24 horas a 37 °C

8.6. Medir el halo de solubilización con vernier

8.7. Determinar el índice de solubilización con la siguiente ecuación

Cálculo 1

$$SI = \frac{\text{diámetro colonia} + \text{Halo de solubilización}}{\text{diámetro de la colonia}}$$

9. Esterilización de material

Esterilizar área de trabajo, puntas de micropipeta, micropipetas y medio enriquecido

10. Cálculos

No aplica

11. Control de calidad

11.1. Verificar que se cuenta con todo el material antes de iniciar el procedimiento

11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado
4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

N/A

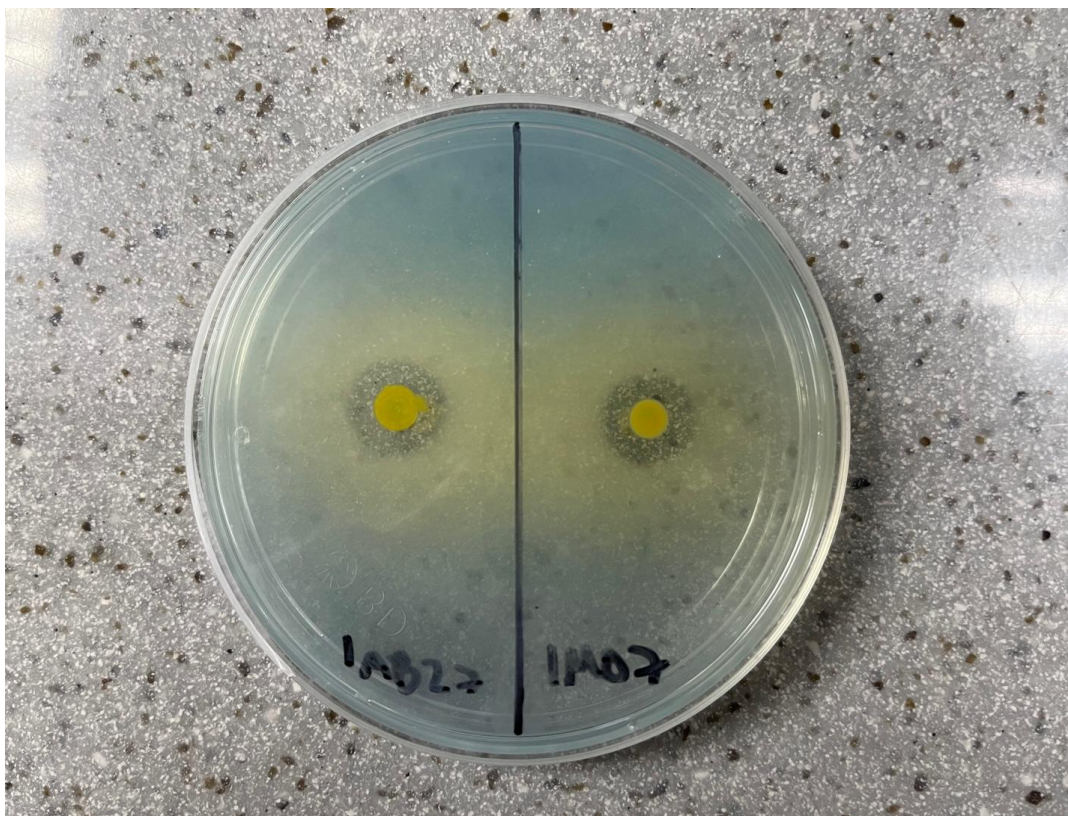


Figura 15: Aspecto del halo de solubilización en medio NBRIP.

Anexo 4. Procedimiento normado de operación

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales:
Cuantificación de fosfato solubilizado	Autores: PhD Dalia Lau-Bonilla, Xavier Flores-Solares

1. Propósito

Realizar una prueba para la determinación del índice de solubilización de fosforo en medios de cultivo bacterianos.

2. Aplicación

El fósforo solubilizado en un medio líquido indica que la bacteria contiene mecanismos para la solubilización de fosfatos, la bioprospección orientada al sector agrícola utiliza esta prueba para determinar si una bacteria tiene propiedades que la hagan promotora del crecimiento vegetal PGPB por medio de la solubilización de fosfatos. La

prueba mide la transformación de fosfato tricálcico a formas solubles de fósforo a través de la reacción de Murphy y Riley.

3. Referencias

- 3.1. Nielsen, S. S., Cho, Y. H., y Nielsen, S. S. (2017). Phosphorus determination by Murphy-Riley method. Food Analysis Laboratory Manual, 153-156.
- 3.2. Kiprotich, K. et al. (2023) Molecular characterization and mineralizing potential of phosphorus solubilizing bacteria colonizing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizosphere in western Kenya, International Journal of Microbiology, 2023, pp. 1–10. doi:10.1155/2023/6668097.

4. Terminología

- 4.1. PGPB: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
- 4.2. ADN: ácido desoxirribonucleico. Molécula transportadora de información genética para el funcionamiento.
- 4.3. EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. Elimina o reduce la cantidad de calcio mediante la eliminación de iones de doble capacidad.

5. Documentos asociados

N/A

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles que diseminen la bacteria.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de bacterias.
Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.9. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Micropipetas de 1000 μ L
- 7.1.2. Micropipetas de 100 μ L
- 7.1.3. Micropipetas de 10 μ L
- 7.1.4. Estufa con agitador magnético

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Caja petri desechable

7.2.2. Puntas de micropipeta de 1000 μL

7.2.3. Puntas de micropipeta de 100 μL

7.2.4. Puntas de micropipeta de 10 μL

7.2.5. Frasco Erlenmeyer de 450 mL

7.2.6. Medidor vernier

7.3. **Reactivos**

7.3.1. Glucosa

7.3.2. Fosfato de calcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

7.3.3. Cloruro de magnesio hexahidratado $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

7.3.4. Sulfato de magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

7.3.5. Cloruro de potasio KCl

7.3.6. Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

7.3.7. Agar bacteriológico

7.3.8. Medio LB líquida

7.4. **Medicamentos**

7.4.1. N/A

7.5. **Material biológico**

7.5.1. Cepas de bacterias PSB

8. **Procedimiento**

8.1. Aislar la bacteria de forma efectiva

8.2. Colocar a la bacteria en 1mL de medio LB líquido, incubar a 37 °C 24 horas

8.2.1.1. Verter 10 μL del cultivo bacteriano en un tubo cónico de 25 mL con
20mL de medio NBRIP.

- 8.3. Incubar en agitación constante 24 horas 28 °C a 160 rpm
- 8.4. Colectar 1 mL y transferir a microtubo de 1.5 mL
- 8.5. Centrifugar a 13,500 rpm 5 min
- 8.6. Extraer 1mL de sobrenadante
- 8.7. Mezclar con 200uL del reactivo de Murphy y Riley y 50uL de agua ultra pura
- 8.8. Lectura a 800nm en espectrofotómetro UV-VIS

9. Esterilización de material

Esterilizar área de trabajo, puntas de micropipeta, micropipetas y medio enriquecido

10. Cálculos

N/A

11. Control de calidad

- 11.1. Verificar que se cuenta con todo el material antes de iniciar el procedimiento
- 11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado
4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

N/A

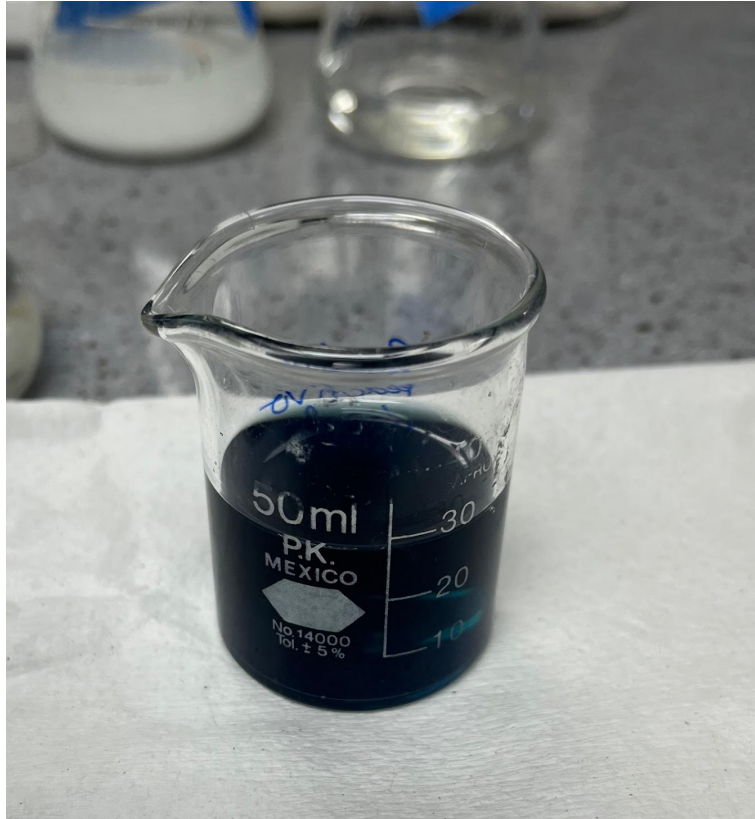


Figura 16: Reactivo de Murphy y Riley

Anexo 5. Procedimiento normado de operación

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales:
Ensayo de actividad fosfatasa alcalina bacteriana	Autores: PhD Dalia Lau-Bonilla, Xavier Flores-Solares

1. Propósito

El propósito de esta investigación es utilizar una prueba para determinar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina bacteriana, con el objetivo de cuantificar su capacidad para solubilizar fosfatos a través de esta enzima.

2. Aplicación

Una actividad elevada de la enzima fosfatasa alcalina indica que la bacteria es capaz de solubilizar fosfatos por medio de esta enzima, la bioprospección orientada al sector agrícola utiliza esta prueba para determinar si una bacteria tiene propiedades que la hagan promotora del crecimiento vegetal PGPB por medio de la solubilización de fosfatos. La prueba mide la transformación de p-nitrofenil phosphate a p-nitrofenol.

3. Referencias

- 3.1. Nielsen, S. S., Cho, Y. H., y Nielsen, S. S. (2017). Phosphorus determination by Murphy-Riley method. *Food Analysis Laboratory Manual*, 153-156.
- 3.2. Kiprotich, K. *et al.* (2023) ‘Molecular characterization and mineralizing potential of phosphorus solubilizing bacteria colonizing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizosphere in western Kenya’, *International Journal of Microbiology*, 2023, pp. 1–10. doi:10.1155/2023/6668097.

4. Terminología

- 4.1. PGPB: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
- 4.2. ADN: ácido desoxirribonucleico. Molécula transportadora de información genética para el funcionamiento.
- 4.3. EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. Elimina o reduce la cantidad de calcio mediante la eliminación de iones de doble capacidad.
- 4.4. MUB: Modified Universal Buffer. Buffer utilizado para la estabilización de enzimas de suelo.

5. Documentos asociados

N/A

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

6.1.1. Formación de aerosoles que diseminen la bacteria.

6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de bacterias.

Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio

6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.

6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.

6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.

6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.

6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.

6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.

6.2.8. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.

6.2.9. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Micropipetas de 1000 μ L
- 7.1.2. Micropipetas de 100 μ L
- 7.1.3. Micropipetas de 10 μ L
- 7.1.4. Estufa con agitador magnético

7.2. **Materiales/ Cristalería**

- 7.2.1. Caja petri desechable
- 7.2.2. Puntas de micropipeta de 1000 μ L
- 7.2.3. Puntas de micropipeta de 100 μ L
- 7.2.4. Puntas de micropipeta de 10 μ L
- 7.2.5. Frasco Erlenmeyer de 400 μ L
- 7.2.6. Papel filtro Whatman. No. 42

7.3. **Reactivos**

- 7.3.1. Modified Universal Buffer (MUB) pH 6.5
- 7.3.2. Disodium p-nitrophenyl phosphate (tetrahydrate)
- 7.3.3. Tolueno
- 7.3.4. NaOH
- 7.3.5. CaCl₂
- 7.3.6. Medio LB líquida

7.4. **Medicamentos**

- 7.4.1. N/A

7.5. **Material biológico**

- 7.5.1. Cepas de bacterias PSB

8. Procedimiento

- 8.1. Aislar la bacteria de forma efectiva
- 8.2. Colocar a la bacteria en 1mL de medio LB líquido, incubar a 37 °C 24 horas
 - 8.2.1.1. Verter 10uL del cultivo bacteriano en un tubo cónico de 25 mL con 20mL de medio NBRIP.
- 8.3. Incubar a 37 °C durante 48 horas
- 8.4. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C
- 8.5. Colectar 1 mL del sobrenadante y transferirlo a tubo cónico de 15 mL
- 8.6. Agregar 4 mL de MUB
- 8.7. Agregar 1 mL de disodium p-nitrophenyl phosphate (tetrahydrate) 0.025 mM
- 8.8. Incubar a 37 °C durante 1 hora
- 8.9. Agregar 2 gotas de tolueno con pipeta Pasteur
- 8.10. Agregar 4 mL de NaOH 0.5 M
- 8.11. Agregar 1 mL de CaCl₂ 0.5 M
- 8.12. Filtrar el contenido con papel Whatman No. 42
- 8.13. Medir la concentración de p-nitrofenol a 420nm en espectrofotómetro UV-VIS

9. Esterilización de material

Esterilizar área de trabajo, puntas de micropipeta, micropipetas y medio enriquecido

10. Cálculos

N/A

11. Control de calidad

- 11.1. Verificar que se cuenta con todo el material antes de iniciar el procedimiento

- 11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado
4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

N/A

Anexo 6. Procedimiento normado de operación

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
Amplificación del gen PhoD bacteriano	Páginas Totales: Autores: PhD Dalia Lau-Bonilla, Xavier Flores-Solares

1. Propósito

El propósito de este procedimiento es amplificar copias de ADN correspondientes al gen *PhoD* bacteriano presente en el regulón *Pho*, lo que se interpreta como positivo para la presencia de este gen en el genoma de la cepa bacteriana de interés.

2. Aplicación

Una prueba positiva para la amplificación del gen *PhoD* indica que la bacteria es capaz de solubilizar fosfatos por medio de la enzima fosfatasa alcalina, la bioprospección orientada al sector agrícola utiliza esta prueba para determinar si una bacteria tiene propiedades que la hagan promotora del crecimiento vegetal PGPB por medio de la solubilización de fosfatos. La prueba mide la amplificación del gen con reacción en cadena de polimerasa (PCR) y por medio de electroforesis en agarosa.

3. Referencias

- 3.1. Kiprotich, K. *et al.* (2023) ‘Molecular characterization and mineralizing potential of phosphorus solubilizing bacteria colonizing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizosphere in western Kenya’, *International Journal of Microbiology*, 2023, pp. 1–10. doi:10.1155/2023/6668097.

4. Terminología

- 4.1. PGPB: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
- 4.2. ADN: ácido desoxirribonucleico. Molécula transportadora de información genética para el funcionamiento.
- 4.3. EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. Elimina o reduce la cantidad de calcio mediante la eliminación de iones de doble capacidad.
- 4.4. PCR: Reacción en cadena de polimerasa. Técnica de biología molecular para la detección de material genético.

5. Documentos asociados

N/A

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

6.1.1. Formación de aerosoles que diseminen la bacteria.

6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de bacterias.

Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.

6.1.3. Tener contacto directo con la piel y el agente intercalante utilizado.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio

6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.

6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.

6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.

6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.

6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.

6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.

6.2.8. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.

6.2.9. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Micropipetas de 1000 μ L
- 7.1.2. Micropipetas de 100 μ L
- 7.1.3. Micropipetas de 10 μ L
- 7.1.4. Estufa con agitador magnético
- 7.1.5. Cámara de electroforesis
- 7.1.6. Termociclador

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Microtubos de 0.5 mL para PCR
- 7.2.2. Puntas de micropipeta de 10 μ L
- 7.2.3. Frasco Erlenmeyer de 400 μ L
- 7.2.4. Papel filtro Whatman. No. 42
- 7.2.5. Palillos de madera estériles

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Reverse Primer
- 7.3.2. Forward Primer
- 7.3.3. Agua ultra pura
- 7.3.4. MasterMix Colorless Gotaq

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. N/A

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Cepas de bacterias PSB

8. Procedimiento

- 8.1. Aislar la bacteria de forma efectiva

8.2. Calcular la cantidad de MasterMix para las reacciones necesarias

Cuadro 7: Reactivo

Reactivo	1X reacción
MasterMix	12.5uL
Primer F	1.5uL
Primer R	1.5uL
Agua	9.5uL

8.3. Servir 25 uL del MasterMix preparado en tubos de 0.5mL para PCR

8.4. Tocar la colonia bacteriana con un palillo de madera estéril

8.5. Agitar el palillo en el MasterMix

8.6. Colocar las muestras en Termociclador y seguir el ciclo de amplificación para PhoD.

8.7. Colocar productos de PCR en gel de agarosa al 2 % con 1 uL de GelRed.

8.8. Correr electrodos del gel a 100V por 30 min.

8.9. Visualizar gel en Transiluminador.

9. Esterilización de material

Esterilizar área de trabajo, puntas de micropipeta, micropipetas y medio enriquecido

10. Cálculos

N/A

11. Control de calidad

11.1. Verificar que se cuenta con todo el material antes de iniciar el procedimiento

11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado
4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

N/A